

VNIVERSITAT VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

(Programa de Doctorado RD778/1998)

**VALOR DE LAS SUBPOBLACIONES DE LAS CÉLULAS NATURAL
KILLER Y DEL RECEPTOR DE CITOTOXICIDAD NATURAL NKP44
COMO BIOMARCADORES DE MALIGNIDAD EN DERRAMES
PLEURALES**

Presentada por:

Susana Herrera Lara

Dirigida por:

Dra. Estrella Fernández Fabrellas

Dr. Gustavo Juan Samper

Dra. María M. Morales Suárez-Varela

Valencia 2015



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

La Dra. Estrella Fernández Fabrellas, Profesora Asociada de Medicina de la Universidad de Valencia, el Dr. Gustavo Juan Samper, Profesor Titular de Medicina de la Universidad de Valencia, y la Dra. María M. Morales Suárez-Varela, Catedrática de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN: Que la presente tesis doctoral, titulada “Valor de las subpoblaciones de las células natural killer y del receptor de citotoxicidad natural NKp44 como biomarcadores de malignidad en derrames pleurales”, que presenta Susana Herrera Lara para optar al Grado de Doctora por la Universitat de València, ha sido realizada bajo su dirección en el Servicio de Neumología del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia, y que se encuentra finalizada y lista para su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firman la presente en Valencia, a 14 de octubre de 2015.

Fdo.: Dra. Estrella Fernández Fabrellas

Fdo.: Dr. Gustavo Juan Samper

Fdo.: Dra. María M. Morales Suárez-Varela

“...la ciencia es un esfuerzo de colaboración. Los resultados combinados de varias personas que trabajan juntas es a menudo mucho más eficaz de lo que podría ser el de un científico que trabaja solo” (*John Bardeen, Premio Nobel de Física en 1956 y 1972*).

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido posible gracias al trabajo de muchas personas, que de forma directa o indirecta, han colaborado conmigo y a quienes siempre estaré agradecida.

A mis padres y hermano, que me animan y están siempre a mi lado en todas las fases de mi vida. A Juanma, mi marido, por su apoyo en todo momento y comprensión por el tiempo dedicado a esta tesis.

Mi agradecimiento más sincero a mis directores, por su ayuda indispensable para hacer posible esta tesis.

De forma muy especial, a la Dra. Estrella Fernández Fabrellas, porque siempre estuvo ahí. Me ha estimulado, animado y orientado con paciencia y cariño. Dedicándome su tiempo, conocimiento y esfuerzo. Para mí es un ejemplo a seguir, mi guía en el camino.

Al Dr. Gustavo Juan Samper, por darme la oportunidad de trabajar con él y dirigir esta tesis.

A la Dra. María M. Morales Suárez-Varela, por sus consejos y disponibilidad, sin cuya colaboración en el análisis estadístico no habría sido posible la finalización de esta tesis.

Al Dr. Ignacio Inchaurrega Álvarez y a Dña. M. Asunción Martínez Barona, por su apoyo en la fase de inclusión de pacientes.

Y por último, al Dr. Rafael Andreu Lapiedra, por su cooperación al inicio de esta tesis, a la Dra. Josefa Marco Buades, por su amabilidad y análisis de los fenotipos celulares y a Dña. Amparo Pinilla Moreno, por su predisposición y procesado de las muestras.

A todos los que están y no están presentes en esta página. Gracias.

ÍNDICE	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANATOMÍA PLEURAL	3
1.2. FISIOLÓGÍA PLEURAL	4
1.3. DIAGNÓSTICO DEL DERRAME PLEURAL	6
1.4. DERRAME PLEURAL MALIGNO	14
1.4.1. Epidemiología y etiología del derrame pleural maligno	15
1.4.2. Diagnóstico del derrame pleural maligno	16
1.4.3. Citometría de flujo en el derrame pleural maligno	18
1.5. DERRAME PLEURAL Y CÉLULAS NATURAL KILLER	19
1.5.1. Linfocitos T	19
1.5.2. Células natural killer	20
1.5.2.1. Subpoblaciones de las células natural killer	21
1.5.2.2. Funciones de las células natural killer	24
1.5.2.3. Receptores y ligandos	27
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
2.1. HIPÓTESIS	33
2.2. OBJETIVOS	33
2.2.1. Objetivos principales	33
2.2.2. Objetivos secundarios	34
3. MATERIAL Y MÉTODOS	35
3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	37
3.2. EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ÉTICOS	37

	Pág.
3.3. SELECCIÓN DE COHORTE	37
3.4. METODOLOGÍA	38
3.5. PROCESADO DE LAS MUESTRAS	40
3.5.1. Marcado de antígenos en sangre periférica	41
3.5.2. Marcado de antígenos en líquido pleural	42
3.6. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	42
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
3.7.1. Cálculo del tamaño muestral	48
3.7.2. Análisis estadístico de los resultados	49
3.7.2.1. Análisis univariado	49
3.7.2.2. Análisis multivariado	50
4. RESULTADOS	53
4.1. DATOS GENERALES Y ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA	55
4.1.1. Características basales de la población de estudio	56
4.1.1.1. Edad y sexo de la población de estudio	56
4.1.1.2. Comorbilidades de la población de estudio	57
4.1.1.3. Tabaquismo en la población de estudio	60
4.1.1.4. Antecedentes de cáncer de la población de estudio	61
4.1.1.5. Otras características de la población de estudio	63
4.1.2. Características al diagnóstico de la población de estudio	63
4.1.2.1. Características clínicas de la población de estudio	64
4.1.2.2. Características radiológicas de la población de estudio	65
4.1.2.3. Características analíticas de la población de estudio	67
4.1.2.4. Aspecto del líquido pleural en la población de estudio	68

	Pág.
4.1.2.5. Bioquímica y celularidad del líquido pleural de la población de estudio	68
4.1.2.6. Fenotipos celulares en el líquido pleural de la población de estudio	70
4.1.2.7. Fenotipos celulares en la sangre periférica de la población de estudio	73
4.1.2.8. Predominio de los distintos fenotipos celulares en las muestras estudiadas	75
4.1.3. Diagnóstico etiológico de los derrames pleurales estudiados	79
4.1.3.1. Derrame pleural maligno	80
4.1.3.2. Tumores primarios	82
4.1.3.3. Etiología benigna	83
4.1.4. Éxitus de la población de estudio	83
4.2. CORRELACIÓN DE POBLACIONES LINFOCITARIAS Y NK DEL LÍQUIDO PLEURAL Y SANGRE PERIFÉRICA	85
4.3. DIFERENCIAS EN LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS ENTRE LOS DERRAMES PLEURALES MALIGNOS Y BENIGNOS	86
4.3.1. Diferencias en las poblaciones linfocitarias del líquido pleural entre los derrames pleurales malignos y benignos	86
4.3.2. Diferencias en las poblaciones linfocitarias de la sangre periférica entre los derrames pleurales malignos y benignos	88
4.3.3. Eficacia diagnóstica del estudio de las poblaciones linfocitarias del derrame pleural de etiología desconocida	90
4.4. RATIO DE NK Y SUS SUBPOBLACIONES ENTRE LÍQUIDO PLEURAL Y SANGRE PERIFÉRICA	92

	Pág.
4.4.1. Ratio LP/SP de los diferentes grupos de pacientes	92
4.4.2. Ratio LP/SP entre los derrames pleurales malignos y paramalignos frente a benignos	94
4.4.3. Eficacia diagnóstica de la ratio LP/SP del derrame pleural con sospecha de malignidad	96
4.5. ÁRBOL DE DECISIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO DEL DERRAME PLEURAL DE ETIOLOGÍA DESCONOCIDA	98
4.6. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA KAPLAN-MEIER	103
4.7. MODELO DE REGRESIÓN DE COX CRUDO Y AJUSTADO	104
4.8. PAPEL DEL ANÁLISIS DE POBLACIONES LINFOCITARIAS EN LÍQUIDO PLEURAL Y SANGRE EN EL PRONÓSTICO DEL PACIENTE CON DERRAME PLEURAL	107
4.8.1. Diferencias en las poblaciones linfocitarias del líquido pleural en pacientes éxitus de la población de estudio	107
4.8.1.1. Derrame pleural maligno	108
4.8.1.2. Derrame pleural paramaligno	110
4.8.1.3. Derrame pleural benigno	112
4.8.2. Diferencias en las poblaciones linfocitarias de la sangre periférica en pacientes éxitus de la población de estudio	114
4.8.2.1. Derrame pleural maligno	115
4.8.2.2. Derrame pleural paramaligno	117
4.8.2.3. Derrame pleural benigno	119
4.8.3. Diferencias de la ratio LP/SP de NK en función del éxitus de la población de estudio	121
4.8.3.1. Derrame pleural maligno y paramaligno	121

	Pág.
4.8.3.2. Derrame pleural benigno	124
4.9. ÁRBOL DE DECISIÓN PARA EL PRONÓSTICO DEL DERRAME PLEURAL DE ETIOLOGÍA DESCONOCIDA	126
5. DISCUSIÓN	133
5.1. CARACTERÍSTICAS DEL DISEÑO DEL ESTUDIO	138
5.2. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	139
5.3. SÍNTOMAS Y SIGNOS	140
5.4. CARACTERÍSTICAS DEL LÍQUIDO PLEURAL	141
5.5. DIAGNÓSTICO DE LOS DERRAMES PLEURALES	144
5.6. PAPEL DE LOS FENOTIPOS CELULARES EN EL DIAGNÓSTICO DEL DERRAME PLEURAL DE ETIOLOGÍA DESCONOCIDA	146
5.6.1. Fenotipos celulares en líquido pleural	146
5.6.2. Fenotipos celulares en sangre periférica	149
5.6.3. Fenotipos celulares en líquido pleural y sangre periférica	149
5.6.4. Correlación de las poblaciones de NK entre líquido pleural y sangre periférica	152
5.6.5. Eficacia diagnóstica del análisis de los fenotipos celulares	152
5.6.6. Ratio LP/SP de NK y sus subpoblaciones	153
5.6.7. Árbol de decisión para el diagnóstico del derrame pleural de etiología desconocida	155
5.7. SUPERVIVENCIA DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	157

	Pág.
5.7.1. Árbol de decisión para el pronóstico del derrame pleural de etiología desconocida	160
5.8. LIMITACIONES DEL TRABAJO	162
5.9. IMPLICACIONES CLÍNICAS	162
6. CONCLUSIONES	165
7. BIBLIOGRAFÍA	169
ANEXO 1: HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	185
ANEXO 2: BECA OTORGADA AL PROYECTO	191

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.1. Composición y pH normales del líquido pleural.	5
Tabla 1.2. Subpoblaciones y funciones de las células NK	24
Tabla 4.1. Características basales de la población de estudio. Edad y sexo.	57
Tabla 4.2. Características basales de la población de estudio. Comorbilidades.	58
Tabla 4.3. Características basales de la población de estudio. Comorbilidades.	59
Tabla 4.4. Características basales de la población de estudio. Tabaquismo.	60
Tabla 4.5. Características basales de la población de estudio. Antecedentes de cáncer.	61
Tabla 4.6. Características basales de la población de estudio. Antecedentes personales de cáncer. Localización del tumor.	62
Tabla 4.7. Características basales de la población de estudio. Antecedentes personales de cáncer. Histología del tumor.	62
Tabla 4.8. Otras características basales de la población de estudio.	63
Tabla 4.9. Bioquímica del líquido pleural de la población de estudio.	69
Tabla 4.10. Celularidad del líquido pleural de la población de estudio.	70
Tabla 4.11. Poblaciones linfocitarias en líquido pleural.	71
Tabla 4.12. Poblaciones NK en líquido pleural.	72
Tabla 4.13. Poblaciones linfocitarias en sangre periférica.	73
Tabla 4.14. Poblaciones NK en sangre periférica.	74
Tabla 4.15. Éxito y tiempo de supervivencia y seguimiento de la población de estudio.	84
Tabla 4.16. Correlación de poblaciones linfocitarias y NK del líquido pleural y sangre periférica.	85

	Pág.
Tabla 4.17. Diferencias en las poblaciones linfocitarias del líquido pleural entre los derrames malignos y benignos.	86
Tabla 4.18. Diferencias en las poblaciones linfocitarias del líquido pleural entre los derrames malignos y benignos. Poblaciones NK.	87
Tabla 4.19. Diferencias en las poblaciones linfocitarias de la sangre periférica entre los derrames malignos y benignos.	88
Tabla 4.20. Diferencias en las poblaciones linfocitarias de la sangre periférica entre los derrames malignos y benignos. Poblaciones NK.	89
Tabla 4.21. Ratio LP/SP de NK y sus subpoblaciones en los diferentes grupos de pacientes.	93
Tabla 4.22. Ratio LP/SP de NK y sus subpoblaciones entre los derrames malignos-paramalignos y benignos.	95
Tabla 4.23. Clasificación de los derrames pleurales estudiados (CHAID).	100
Tabla 4.24. Clasificación de los derrames pleurales estudiados (CHAID con variables categóricas).	103
Tabla 4.25. Modelo de regresión de Cox crudo de las poblaciones linfocitarias del líquido pleural en función del riesgo de los pacientes fallecidos frente a los que no fallecen.	105
Tabla 4.26. Modelo de regresión de Cox crudo de las poblaciones linfocitarias de la sangre periférica en función del riesgo de los pacientes fallecidos frente a los que no fallecen.	105
Tabla 4.27. Modelo de regresión de Cox crudo de la ratio LP/SP de NK y sus subpoblaciones en función del riesgo de los pacientes fallecidos frente a los que no fallecen.	106
Tabla 4.28. Modelo de regresión de Cox ajustado en función del riesgo de los pacientes fallecidos frente a los que no fallecen.	106

	Pág.
Tabla 4.29. Diferencias en las poblaciones linfocitarias del líquido pleural del derrame maligno en función del éxitus.	108
Tabla 4.30. Diferencias en las poblaciones NK del líquido pleural del derrame maligno en función del éxitus.	109
Tabla 4.31. Diferencias en las poblaciones linfocitarias del líquido pleural del derrame paramaligno en función del éxitus.	110
Tabla 4.32. Diferencias en las poblaciones NK del líquido pleural del derrame paramaligno en función del éxitus.	111
Tabla 4.33. Diferencias en las poblaciones linfocitarias del líquido pleural del derrame benigno en función del éxitus.	112
Tabla 4.34. Diferencias en las poblaciones NK del líquido pleural del derrame benigno en función del éxitus.	113
Tabla 4.35. Diferencias en las poblaciones linfocitarias de la sangre periférica del derrame maligno en función del éxitus.	115
Tabla 4.36. Diferencias en las poblaciones NK de la sangre periférica del derrame maligno en función del éxitus.	116
Tabla 4.37. Diferencias en las poblaciones linfocitarias de la sangre periférica del derrame paramaligno en función del éxitus.	117
Tabla 4.38. Diferencias en las poblaciones NK de la sangre periférica del derrame paramaligno en función del éxitus.	118
Tabla 4.39. Diferencias en las poblaciones linfocitarias de la sangre periférica del derrame benigno en función del éxitus.	119
Tabla 4.40. Diferencias en las poblaciones NK de la sangre periférica del derrame benigno en función del éxitus.	120
Tabla 4.41. Diferencias en la ratio LP/SP de NK del derrame maligno en función del éxitus.	122
Tabla 4.42. Diferencias en la ratio LP/SP de NK del derrame paramaligno en función del éxitus.	123

	Pág.
Tabla 4.43. Diferencia en la ratio LP/SP de NK del derrame benigno en función del éxito.	125
Tabla 4.44. Clasificación en función del éxito del derrame pleural de etiología desconocida (CHAID).	128

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 3.1. Modificado de Cooper y colaboradores ¹³⁵ . Histograma de doble parámetro y diagrama de puntos.	43
Figura 3.2. Representación gráfica de linfocitos T y células NK en líquido pleural de uno de nuestros pacientes con derrame pleural maligno.	44
Figura 3.3. Representación de NK CD56 bright y NK CD56 dim.	45
Figura 3.4.A. Representación de las subpoblaciones de NK.	46
Figura 3.4.B. Ejemplo de diagrama de puntos de las subpoblaciones de NK en líquido pleural.	47
Figura 3.4.C. Ejemplo de histograma.	47
Figura 3.5. Ejemplo de informe del análisis de uno de nuestros pacientes.	48
Figura 4.1. Flujo de pacientes incluidos en el estudio.	55
Figura 4.2. Síntomas de la población de estudio.	64
Figura 4.3. Síndrome constitucional de la población de estudio.	65
Figura 4.4. Características radiológicas de la población de estudio (1).	66
Figura 4.5. Características radiológicas de la población de estudio (2).	66
Figura 4.6. Características radiológicas del derrame pleural de la población de estudio.	67
Figura 4.7. Aspecto del líquido pleural en la población de estudio.	68
Figura 4.8 A. Linfocitos totales en líquido pleural y sangre periférica.	75
Figura 4.8 B. Linfocitos T en líquido pleural y sangre periférica	76
Figura 4.9. Células NK en líquido pleural y sangre periférica.	76
Figura 4.10. Poblaciones NK predominantes en líquido pleural en nuestro estudio.	77
Figura 4.11. Poblaciones NK en líquido pleural y sangre periférica en los derrames malignos.	78
Figura 4.12. Poblaciones NK en líquido pleural y sangre periférica en	

	Pág.
los derrames paramalignos	78
Figura 4.13. Poblaciones NK en líquido pleural y sangre periférica en los derrames benignos.	79
Figura 4.14. Diagnósticos de los derrames pleurales de la población de estudio.	80
Figura 4.15. Diagnóstico del derrame pleural maligno.	81
Figura 4.16. Tumores primarios de la población de estudio.	82
Figura 4.17. Curva COR del CD56dim CD16- en sangre periférica.	90
Figura 4.18. Curva COR del CD56dim CD16+ en sangre periférica.	91
Figura 4.19. Curva COR del NK CD16+ en sangre periférica.	91
Figura 4.20. Curva COR de la ratio LP/SP de CD56bright CD16-.	96
Figura 4.21. Curva COR de la ratio LP/SP de CD56dim CD16-.	97
Figura 4.22. Diagrama de árbol para el diagnóstico del derrame pleural de etiología desconocida.	99
Figura 4.23. Diagrama de árbol para el diagnóstico del derrame pleural de etiología desconocida con las variables categóricas.	102
Figura 4.24. Curva de supervivencia. Kaplan-Meier.	104
Figura 4.25. Árbol de decisión para el pronóstico del derrame pleural de etiología desconocida.	127

LISTADO DE ABREVIATURAS

A: Área de membrana

ADA: Adenosina Desaminasa

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de la Varianza

C.: Cirugía

CA: Antígenos de Hidratos de Carbono

cap: Capilar

CD: Cluster of Differentiation

CEA: Antígeno Carcinoembrionario

CEIC: Comité de Ética y Ensayos Clínicos

CHAID: Chi-square Automatic Interaction Detector

COR: Característica Operativa del Receptor

CYFRA 21-1: Citoqueratina 19 Fragmentos

DE: Desviación Estándar

DM: Diabetes Mellitus

E.: Enfermedad

EPID: Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

Exp.: Exposición

GM-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Granulocito-Macrófago

HR: Hazard Ratio

I.: Insuficiencia

IC: Intervalo de Confianza

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

Ig-SF: Superfamilia de las Inmunoglobulinas

IL: Interleuquina

L: Linfocitos

LDH: Lactato Deshidrogenasa
L_p: Coeficiente de Filtración por Unidad de Área
LP/SP: Líquido Pleural/Sangre Periférica
MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NCR: Receptores de Citotoxicidad Natural
NK: Natural Killer
O: Presión Oncótica
P: Presión Hidrostática
PA: Posteroanterior
PBS: Phosphate Buffered Saline
pH: Potencial de Hidrogeniones
pl: Pleural
Q_f: Movimiento Líquido
R_d: Coeficiente de Reflexión de Solutos para Proteínas
RNM: Resonancia Magnética
SEPAR: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica
T.: Tiempo
TAC: Tomografía Axial Computarizada
TBC: Tuberculosis
TCR: Receptor de Células T
TEP: Tromboembolismo Pulmonar
TNF: Factor de Necrosis Tumoral
VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
VHC: Virus Hepatitis C
VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

LISTADO DE UNIDADES

células/mm³: células/milímetro cúbico

cm: centímetro

g: gramo

g/dl: gramo/decilitro

mg/dl: milígramo/decilitro

ml/kg: mililitro/kilogramo

ml: mililitro

paq/año: paquetes/año

r.p.m.: revoluciones por minuto

UI/L: unidad internacional / litro

μl: microlitro

μm: micra

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANATOMÍA PLEURAL

La pleura es una membrana serosa que recubre el pulmón, el mediastino, el diafragma y la pared costal de forma separada en cada hemitórax¹.

Está formada por dos hojas, la parietal, que reviste la pared torácica, el diafragma y mediastino, y la visceral, dispuesta sobre la superficie externa del pulmón, dando lugar entre ambas hojas al espacio pleural.

El sistema linfático de la pleura parietal es la vía principal para el drenaje de líquido y células del espacio pleural, especialmente en las zonas más declives². Entre las células mesoteliales de la pleura parietal existen numerosos poros o estomas de 6-8 μm de diámetro que comunican con unos espacios lacunares de donde parten los vasos linfáticos^{3,4}. Sin embargo, la pleura visceral carece de estomas y espacios lacunares y parece que sus vasos linfáticos no conectan con el espacio pleural⁵, sino que penetran en el parénquima pulmonar existiendo una conexión directa con el sistema linfático pulmonar, de manera que la linfa fluye hacia la parte medial del pulmón para desembocar por último en los ganglios linfáticos hiliares².

Únicamente la pleura parietal posee fibras nerviosas sensitivas en su capa de tejido conectivo, procedentes de los nervios intercostales y frénico, por lo que siempre que exista dolor pleurítico indica afectación de la pleura parietal^{6,7}.

El espacio pleural es de aproximadamente 10-20 μm de ancho y en su interior contiene en condiciones normales una pequeña cantidad de líquido seroso que lubrica y mantiene independientes ambas membranas pleurales⁸. El aumento de líquido que tiene lugar en numerosas patologías, provoca el derrame pleural.

1.2. FISIOLÓGÍA PLEURAL

La función principal de la pleura es facilitar el movimiento de los pulmones en el interior de la caja torácica armonizando las fuerzas elásticas y no elásticas torácicas y pulmonares, para disminuir el gasto energético de los movimientos de expansión y retracción pulmonar. Ésto es posible gracias a la existencia de una presión negativa intrapleural, que evita el colapso del pulmón, y a que las dos hojas pleurales se deslizan una sobre la otra gracias a la presencia de la fina capa de líquido pleural que hay entre ellas⁹.

En condiciones fisiológicas esta capa de líquido pleural es un ultrafiltrado del plasma, resultado de la filtración y reabsorción pleural. El volumen aproximado en cada hemitórax es de $0,13 \pm 0,06$ ml/kg de peso corporal¹⁰ y la tasa de producción y reabsorción es de unos pocos mililitros al día¹¹. Las dos mucosas actúan como membranas semipermeables, de manera que la concentración en el líquido pleural de moléculas de pequeño tamaño como la glucosa es similar a la del plasma, mientras que la concentración de macromoléculas como la albúmina es considerablemente menor que en el plasma¹. La composición del líquido pleural en condiciones normales se muestra en la tabla 1.1^{7, 10}.

En la actualidad, la teoría más admitida en la formación y reabsorción de líquido pleural es la que postula que el líquido pleural proviene de los vasos sistémicos de ambas pleuras, parietal y visceral, fluye a través de las membranas pleurales hacia el interior del espacio pleural y desde allí se reabsorbe por los estomas y linfáticos de la pleura parietal¹², cuya capacidad de absorción aumenta de forma considerable en el caso de existir un derrame pleural¹³.

Asimismo, los movimientos del líquido en el interior de la cavidad pleural están regidos por la ecuación de Starling¹⁴.

$$Q_f = L_p \cdot A [(P_{cap} - P_{pl}) - R_d (O_{cap} - O_{pl})]$$

(Q_f = movimiento líquido; L_p = coeficiente de filtración por unidad de área; A = área de membrana; P = presión hidrostática; O = presión oncótica; pl = pleural; cap = capilar; y R_d = coeficiente de reflexión de solutos para proteínas).

Por tanto, el flujo de líquido a través de las membranas pleurales es controlado por la suma de las presiones oncóticas e hidrostáticas de los capilares pleurales y el espacio pleural.

Tabla 1.1. Composición y pH normales del líquido pleural.

Volumen	0,13 ± 0,06 ml/kg
Células/mm ³	1.000-5.000
<ul style="list-style-type: none"> • Células mesoteliales • Macrófagos • Linfocitos • CD4/CD8 	0–2% 64–80% 18–36% 0,6-1
Proteínas	1-2 g/dl
Albúmina	50–70%
Glucosa	Similar al plasma
LDH	<50% del valor en plasma
pH	plasma

Tomado de Chillón Martín, MJ. Embriología, anatomía y fisiología pleural. En Pérez Rodríguez E, Villena Garrido MV editores. Enfermedades de la pleura. Neumomadrid. 2003; 14^o. CD (Cluster of Differentiation), LDH (Lactato Deshidrogenasa), pH (Potencial de Hidrogeniones).

Finalmente, si la cantidad de líquido que se forma es mayor que la que puede ser retirado por los linfáticos se origina el derrame pleural. De esta manera, el derrame pleural puede deberse a un incremento en la formación de líquido pleural, a una disminución del aclaramiento del líquido pleural por los linfáticos, o a la combinación de ambos factores.

Para Sahn⁸ existen seis mecanismos responsables de la acumulación de líquido en el espacio pleural:

1. Aumento de las presiones hidrostáticas cuando se elevan las presiones capilares en la circulación pulmonar.

2. Descenso de la presión oncótica en la microcirculación.

3. Descenso de la presión en el espacio pleural (o lo que es lo mismo, aumento de la presión negativa) en presencia de atelectasia pulmonar masiva.

4. Aumento de la permeabilidad en la microcirculación cuando la pleura está directamente implicada en el proceso patológico (**exudado**).

5. Deterioro del drenaje linfático, principal mecanismo responsable de la persistencia de derrame en la pleura. El bloqueo linfático puede producirse en la misma zona subpleural, o en el mediastino, y en ambos casos la reabsorción de líquido se verá seriamente comprometida.

6. Llegada de líquido desde el espacio peritoneal a través de pequeñas comunicaciones transdiafragmáticas.

1.3. DIAGNÓSTICO DEL DERRAME PLEURAL

La prevalencia del derrame pleural es ligeramente superior a 400/100.000 habitantes y las causas de aparición son muy numerosas, siendo la más frecuente la insuficiencia cardiaca congestiva, y entre los exudados el derrame pleural paraneumónico, **neoplásico** o el secundario a tromboembolia pulmonar¹⁵.

Los pacientes con derrame pleural deben estudiarse de forma sistemática. En primer lugar, se debe realizar una anamnesis con énfasis especial en la exposición a amianto, toma de medicamentos y la existencia de otras enfermedades como cardiopatías, tuberculosis, neoplasias o colagenosis.

Los síntomas más prevalentes son la disnea, el dolor torácico y la tos seca. Las características de estos síntomas y los signos acompañantes variarán según el tipo de patología pleural y el grado de afectación de la misma.

1. La disnea: es el síntoma más frecuente¹⁶. Si bien el volumen del derrame puede influir en el grado de la disnea, no siempre existe una relación directa entre ambos. Es posible que la existencia de dolor acompañante o la patología pulmonar subyacente así como la velocidad de acumulación del líquido justifiquen esta disociación¹⁷.
2. El dolor torácico: en el caso del derrame pleural con irritación pleural, es agudo, preciso y aumenta con la respiración profunda y la tos. Cuando se localiza en el hombro y cuello el proceso afecta a la región central de la pleura diafragmática por la inervación del nervio frénico.
3. Tos seca: puede estar relacionada con la inflamación pleural o compresión de los bronquios por el derrame pleural, que irrita las paredes de los mismos y estimula el reflejo de la tos.

Aproximadamente el 15% de los pacientes con derrame pleural están asintomáticos¹⁸.

Mediante las técnicas de imagen podemos detectar la acumulación de líquido en el espacio pleural y diagnosticar la presencia de derrame pleural. Sin embargo, no siempre la presencia de líquido pleural indica enfermedad, pudiéndose detectar en un 4-6% de individuos sanos pequeñas cantidades de este en el espacio pleural¹⁹. La radiografía de tórax es la técnica radiológica inicial en el estudio del derrame pleural, siendo la ecografía, la tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia magnética (RNM) técnicas complementarias en el abordaje posterior²⁰.

La radiografía de tórax suele objetivar un derrame pleural superior a 75 ml¹⁵, siendo la proyección posteroanterior (PA) anormal en presencia de

aproximadamente 200 ml de líquido pleural y sólo 50 ml son suficientes para ser detectables en la lateral²¹. Pequeñas cantidades de líquido pueden producir atelectasias por compresión del pulmón adyacente y los derrames masivos, un colapso pulmonar completo.

La ecografía torácica es un procedimiento de gran utilidad, no sólo en la determinación del derrame sino también en su utilización como guía para realizar técnicas invasivas. Es recomendable que se realice por el mismo facultativo que hace la punción, incrementando la rentabilidad y disminuyendo las complicaciones de la toracocentesis²². Esta técnica es más sensible que la radiografía en la identificación del derrame pleural y que la TAC para la identificación de septos.

La TAC detecta pequeñas cantidades de líquido y ayuda a caracterizar mejor la localización y disposición del derrame. Sus indicaciones generales son diferenciar la patología pleural de la pulmonar, definir el derrame como libre o loculado, servir de guía terapéutica, identificar la colocación de drenajes torácicos, detectar las complicaciones de los derrames y los cambios residuales secundarios a éstos^{23,24}.

La RNM tiene un papel limitado en el derrame pleural, teniendo una resolución ligeramente superior a la TAC en la caracterización del líquido.

Con los datos clínicos y radiológicos debe establecerse un diagnóstico de presunción. En pacientes con derrame pleural bilateral y en un contexto clínico que sugiera fuertemente un trasudado, no está indicada la realización de toracocentesis²⁵. En el resto de situaciones se realizará una toracocentesis si la cuantía del líquido lo permite.

La toracocentesis es la extracción de líquido pleural con fines diagnósticos o terapéuticos²⁶. Es una técnica sencilla, rápida, con alto rendimiento diagnóstico y escasas complicaciones¹⁷. Para realizarla, el paciente debe estar sentado, con

la espalda recta y los brazos elevados y apoyados sobre una mesilla para que los diafragmas descendan y los espacios intercostales se amplíen al máximo. Una vez elegido cuidadosamente el sitio se desinfecta la piel y se anestesia mediante la inyección de lidocaína al 2% con una aguja de calibre 21. Es importante la forma de administración de la anestesia local, no sólo haciendo una pápula subcutánea sino anestesiando todo el trayecto desde la piel hasta la pleura parietal²⁶. Posteriormente, se introduce la aguja o catéter conectada a una jeringa de 50 ml, siempre siguiendo el borde superior de una costilla para no dañar el paquete vasculonervioso, y se extrae el líquido aspirando despacio. Sus complicaciones más frecuentes son la reacción vagal (10-14%) y el neumotórax (3-8%).

En el estudio del líquido pleural el aspecto proporciona una información muy útil para su orientación etiológica. En la serie de García Luján y colaboradores²⁷, la causa más frecuente de derrames pleurales hemáticos fue la malignidad.

La diferenciación entre trasudados y exudados se considera el paso inicial en el diagnóstico etiológico de cualquier derrame pleural²⁸. Los trasudados se deben mayoritariamente a insuficiencia cardíaca (80%), en cambio los exudados pueden tener numerosas etiologías¹⁵.

En la práctica clínica se diferencian los exudados de los trasudados mediante los criterios de Light²⁹, según los cuales es **exudado** cuando cumple una o más de las siguientes condiciones:

- Cociente de proteínas entre líquido pleural y suero superior a 0,5.
- Cociente de LDH entre líquido pleural y suero superior a 0,6.
- LDH del líquido pleural superior a 2/3 del límite superior de la normalidad de la LDH sérica.

Estos criterios son muy sensibles para el diagnóstico de exudados pleurales pero disminuyen en especificidad, es decir, identifican correctamente la práctica totalidad de los exudados (98%), pero clasifican erróneamente como exudados alrededor del 30% de derrames pleurales cardíacos y el 20% de hidrotórax hepáticos³⁰. Esta circunstancia es particularmente frecuente en pacientes que han recibido tratamiento diurético. Durante la diuresis la presión oncótica de la sangre aumenta y como consecuencia se produce el paso de agua desde el espacio extravascular (incluida la cavidad pleural) a la sangre, con el consiguiente aumento en la concentración de las proteínas en el líquido pleural³¹. La demostración de que el gradiente (resta) de albúmina entre suero y líquido pleural se influía en menor proporción por la diuresis³², ha servido para reafirmar la recomendación del uso alternativo de este gradiente a los criterios de Light en pacientes en tratamiento diurético efectivo. Por lo que si sospechamos insuficiencia cardíaca pero el derrame pleural es un exudado limítrofe, se recomienda calcular el gradiente entre la albúmina del suero y del líquido pleural. Si dicha diferencia es superior a 1,2 g/dl, circunstancia que se da en el 83% de pacientes con estos falsos exudados cardíacos, asumiremos la naturaleza trasudativa del derrame pleural³⁰. Se han propuesto otros criterios para la clasificar a los exudados con menor rentabilidad, como el colesterol en el líquido pleural mayor a 60 mg/dl o el cociente entre el colesterol en líquido pleural y suero superior a 0,3²⁸.

La determinación del pH pleural es útil en el diagnóstico diferencial de los exudados pleurales. Se debe medir con un analizador de gases³³ y evitar la anestesia previa³⁴. Suele oscilar entre 7,45 y 7,55 para los trasudados y entre 7,30 y 7,45 para los exudados. Un pH menor de 7,30 en los **derrames pleurales malignos** se asocia con peor pronóstico, mayor rendimiento de la citología y biopsia pleural y menor éxito de pleurodesis química³⁵. Sin embargo, dos metaanálisis de más de 400 pacientes con derrame pleural maligno han

demostrado que el pH no debería usarse como criterio único para decidir la conveniencia de la pleurodesis o para predecir la supervivencia^{36,37}.

La glucosa en líquido pleural se relaciona con los valores sanguíneos. Se ha demostrado que niveles bajos de glucosa en los **derrames malignos** se correlacionan con un mayor rendimiento diagnóstico de la citología y tienen un valor predictivo de peor pronóstico³⁸.

La LDH en líquido pleural refleja el grado de inflamación de las superficies pleurales. El aumento de los niveles de LDH en sucesivas toracocentesis es indicativo de empeoramiento de la inflamación pleural. En los exudados pleurales definidos únicamente por la LDH, se debe considerar el diagnóstico de **neoplasia**³⁹.

La adenosina desaminasa (ADA) es una enzima que predomina en el tejido linfoide, sobre todo en linfocitos T. Se observa un incremento de los niveles de ADA en todos los procesos donde la inmunidad celular está estimulada, por lo que se ha confirmado sobre todo su utilidad en la tuberculosis pleural, donde los niveles de ADA en líquido pleural están elevados. En el **derrame pleural maligno** es menor de 35 UI/L en aproximadamente el 95% de los casos.

El análisis de los lípidos del líquido pleural está indicado en los casos de sospecha de quilotorax y pseudoquilotorax. El quilotorax surge por la acumulación del líquido linfático de origen intestinal (quilo) en la cavidad torácica como consecuencia de la rotura u obstrucción del conducto torácico o por el paso de quilo acumulado en el espacio peritoneal (ascitis quilosa). Entre las causas más frecuentes encontramos los **secundarios a enfermedad tumoral (75% son linfomas)**, seguidos de los traumáticos, iatrogénicos e idiopáticos¹⁵. Una apariencia lechosa del líquido pleural se considera típica del quilotorax. Su diagnóstico se realiza si se cumplen los tres criterios siguientes: triglicéridos pleurales mayores de 110 mg/dl, relación de triglicéridos pleura/suero mayor de

1 y un cociente de colesterol pleura/suero menor de 1⁴⁰. Cuando los valores de triglicéridos se encuentran entre 50 y 110 mg/dl, la presencia de quilomicrones en el líquido pleural confirma el diagnóstico. Es obligado diferenciarlo del pseudoquilotórax, que son derrames pleurales de larga evolución con un alto contenido en lípidos no procedentes de la rotura del conducto torácico ni del sistema linfático. Las dos causas más comunes son la tuberculosis y la artritis reumatoide. La presencia de cristales de colesterol en el sedimento del líquido pleural es diagnóstica de pseudoquilotórax. Valores de colesterol por encima de 200 mg/dl son muy sugestivos y la existencia también de un cociente líquido pleural/suero de colesterol igual o superior a 1 lo confirma.

El recuento celular total y diferencial es útil en el diagnóstico de los exudados pleurales. Aunque los leucocitos totales no tienen valor diagnóstico, el predominio linfocitario orienta al diagnóstico de **neoplasia** y tuberculosis pleural³⁹.

La citología del líquido pleural es una de las determinaciones que ofrece mayor rentabilidad para **el diagnóstico de malignidad**. Su sensibilidad oscila entre el 40 y el 87%, y depende principalmente del entrenamiento del citólogo, de la extensión pleural de la neoplasia y de la estirpe tumoral (mayor en adenocarcinoma)¹⁵. El rendimiento de la citología es más alto en las neoplasias de mama y ovario respecto a los linfomas, sarcomas y mesoteliomas²⁸.

El análisis de muestras citológicas secuenciales incrementa la rentabilidad hasta en más del 30% en algunos estudios¹⁵. En uno de ellos, la primera citología resultó positiva en un 65%, la segunda añadió un 27% y la tercera sólo un 5%⁴¹. Por lo tanto, no es rentable repetir la citología más de dos veces y se recomienda añadir toma de muestras mediante biopsia cuando se requiera una segunda citología²⁸.

Si se **sospecha linfoma** puede ser de gran ayuda el estudio del líquido pleural mediante citometría de flujo. Las técnicas de bloque celular o la tinción con inmunocitoquímica son de utilidad clínica. La inmunocitoquímica con anticuerpos monoclonales y el análisis cromosómico tienen una sensibilidad y una especificidad bajas, pero pueden hacer sospechar ciertos procesos tumorales, como los linfomas y la leucemia⁴².

Si con el análisis del líquido pleural no es posible establecer un diagnóstico, se tomarán muestras histológicas pleurales mediante biopsia pleural. Se pueden obtener por diferentes vías de menor a mayor complejidad:

- Biopsia pleural transparietal: es el método más sencillo para obtener tejido pleural. Se deben obtener al menos cuatro fragmentos de pleura parietal para el estudio anatomopatológico, y uno para cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*⁴³, en un acto que requiere sólo anestesia local. La biopsia pleural guiada con métodos de imagen incrementa la sensibilidad hasta valores cercanos a los de la toracoscopia⁴⁴. Las complicaciones en manos expertas son escasas, principalmente el neumotórax, que en la mayoría de series se produce en menos del 10% del total, la infección de la cavidad pleural, el hemotórax y la laceración de hígado o bazo. Su sensibilidad en **el derrame pleural maligno** es inferior a la de la citología, y oscila alrededor del 50%²⁸. Tan sólo, el 7-12% de los pacientes con derrame pleural maligno pueden ser diagnosticados por biopsia pleural cuando la citología es negativa⁴⁵. El uso conjunto de la citología y la biopsia pleural mejora el rendimiento diagnóstico, incrementando la sensibilidad hasta el 73%. La menor sensibilidad de la biopsia pleural se debe a varios factores como el estadio precoz con mínima afectación pleural, la distribución del tumor en áreas no tomadas durante la biopsia ciega y la dificultad en la obtención de muestras bien por la técnica usada y/o experiencia del médico para obtener la biopsia. Si se observa un marcado engrosamiento pleural

difuso con escasa cantidad de líquido o presencia de grandes nódulos en la pleura parietal mediante ecografía o TAC, el rendimiento puede llegar a un 85% si se realiza punción-biopsia guiada por TAC²⁸.

- Toracoscopía: está indicada en un derrame pleural que sigue sin diagnóstico tras la realización de una toracocentesis y una biopsia pleural cerrada o tras toracocentesis seriadas. Esta técnica tiene un rendimiento diagnóstico superior al 95%²⁸, con una sensibilidad en torno al 97%⁴². Además, permite tomar bajo control visual amplias biopsias de la pleura parietal y visceral, valorar la carga tumoral en la cavidad pleural, apreciar la existencia de tabiques y cámaras residuales y realizar el diagnóstico y el tratamiento en el mismo acto, llevando a cabo una pleurodesis química dirigida. En los procesos en que la toracoscopía médica no es posible o no existe diagnóstico tras ella, pueden estar indicadas la cirugía videoasistida o la toracotomía exploradora, pero ésta última causa una alta morbilidad por lo que se debe valorar el riesgo/beneficio.

1.4. DERRAME PLEURAL MALIGNO

El derrame pleural maligno es un problema clínico común en los pacientes con enfermedad neoplásica, su aparición es un signo de enfermedad avanzada ya que implica la afectación del espacio pleural por parte de dicho proceso maligno, además, asocia un deterioro sintomático y un empeoramiento en la calidad de vida que con frecuencia se acompaña de un mal pronóstico con una supervivencia media que varía entre 3 y 12 meses desde el momento del diagnóstico⁴⁶. Dado el mal pronóstico de estos pacientes y la afectación clínica que puede provocar esta entidad, el manejo debe ser precoz, por lo que previo a iniciar un tratamiento se ha de diagnosticar **el derrame pleural maligno**, definido como un exudado en el que se demuestra la presencia de células neoplásicas en el líquido o tejido pleural¹⁵, mediante una citología del líquido

pleural y/o una histología de la pleura con procedimientos como la biopsia percutánea, toracoscopia o toracotomía.

El principal mecanismo de producción del derrame pleural maligno es el aumento de la permeabilidad vascular, frecuentemente asociado a obstrucción del drenaje linfático a nivel pleural y/o mediastínico²⁸. La mayoría de las metástasis pleurales provienen del paso de émbolos tumorales desde el tumor a la pleural visceral y secundariamente a la parietal⁴⁵. La afectación tumoral de la pleura produce cambios reactivos en el mesotelio que pueden determinar descamación o engrosamiento de éste y, en ocasiones, acusada fibrosis pleural.

El **derrame pleural paramaligno**⁴⁵ es aquel que es debido a un proceso tumoral pero sin infiltración pleural directa por el tumor, no se puede demostrar células tumorales ni en el líquido ni en el tejido pleural. Las diferentes causas por las que es producido son la neumonitis obstructiva o atelectasia, el embolismo pulmonar, el bloqueo linfático mediastínico, la obstrucción del conducto torácico (quilotórax), el síndrome de vena cava superior, el pulmón atrapado, el síndrome post-radio/quimioterapia o la hipoalbuminemia²⁸.

1.4.1. EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA DEL DERRAME PLEURAL MALIGNO

El derrame pleural maligno supone entre el 15 y el 35% de todos los derrames pleurales²⁸. La incidencia de los derrames pleurales malignos en los Estados Unidos se estima entre 150.000 y 175.000 casos anuales⁴⁷. Además, es una de las principales causas de exudado pleural, los estudios han demostrado que del 44 al 77% de los exudados pleurales son secundarios a malignidad⁴⁷. La mayoría de los derrames pleurales malignos son producidos por metástasis pleurales, sobre todo de tumores pulmonares (más de un tercio de los casos) y de mama, ambos representan del 50 al 65% de los mismos⁴⁶. Linfomas y, con menos frecuencia, tumores del tracto genitourinario y gastrointestinal entre

otros, también se encuentran asociados⁴⁶. Los derrames pleurales con primario desconocido corresponden al 7-15% de todos los derrames pleurales malignos⁴⁶. El adenocarcinoma es el tipo histológico más frecuente⁴⁷. Pocos estudios han estimado la proporción de derrame pleural debido a mesotelioma (tumor derivado de las células mesoteliales): estudios de los años 1975, 1985 y 1987 identifican mesotelioma en 1/271, 3/472 y 22/592 pacientes respectivamente⁴⁶. Se han descrito antecedentes de contacto a amianto hasta en el 80-90% de los pacientes con mesotelioma pleural, sin embargo, no todos los sujetos con esta exposición lo desarrollan. Por lo tanto, el mesotelioma puede llegar a ser la tercera causa de derrame pleural maligno en pacientes en contacto con amianto²⁸.

1.4.2. DIAGNÓSTICO DEL DERRAME PLEURAL MALIGNO

Una historia previa de enfermedad maligna, antecedentes familiares de neoplasia, consumo de tabaco, así como la exposición a amianto u otros carcinógenos, es importante en el diagnóstico del derrame pleural maligno.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes son los síntomas propios de un gran derrame pleural, es decir, disnea, dolor torácico y tos seca. En una tercera parte de los pacientes, la enfermedad se manifiesta por pérdida de peso, astenia y adenopatías dado que la afectación pleural maligna es indicativa de enfermedad muy avanzada. No obstante, un 25% de pacientes se encuentran asintomáticos en el momento de la presentación del derrame pleural⁴⁶.

Radiológicamente hay que tener en cuenta que:

- La malignidad es la causa más común de derrame pleural masivo⁴⁵.
- Si el mediastino está centrado en presencia de derrame pleural masivo hay que sospechar obstrucción bronquial proximal, fijación del mediastino por tumor y/o adenopatías o infiltración pleural extensa.

- Hay que sospechar neoplasia si se observan nodulaciones pleurales, engrosamiento difuso de la pleura parietal mayor de 1 cm o circunferencial de toda la pleura (incluyendo la mediastínica, que aparece fundamentalmente en mesotelioma avanzado).

En cuanto al líquido pleural, la mayoría se trata de un exudado con predominio linfocitario, principalmente linfocitos T que pueden tener un papel en la defensa local contra la invasión tumoral de la cavidad pleural.

En un intento de incrementar la rentabilidad diagnóstica del líquido pleural para detectar malignidad, se han publicado numerosas series sobre el valor de diversos marcadores tumorales. En un meta-análisis de los marcadores tumorales convencionales: antígeno carcinoembrionario (CEA), antígenos de hidratos de carbono (CA) 15-3, CA 19-9, CA 125 y y citoqueratina 19 fragmentos (CYFRA 21-1), se observó que la medición del CEA en líquido pleural es útil para el diagnóstico diferencial entre mesotelioma pleural y metástasis de cáncer de pulmón, ya que un alto nivel de CEA parece descartar mesotelioma. Así, los marcadores CA 15-3, CA 19-9 y CYFRA 21-1 son muy específicos pero insuficientemente sensibles para diagnosticar derrame pleural maligno, aunque la combinación de dos o más parece aumentar la sensibilidad diagnóstica. Por lo tanto, los marcadores tumorales deben ser interpretados junto a los hallazgos clínicos y a los resultados de las determinaciones habituales^{48,49}.

Recientemente, ha habido un creciente interés por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) porque se encuentra elevado en los derrames pleurales malignos. Un meta-análisis basado en 1.025 pacientes concluyó que el VEGF puede desempeñar un papel en el diagnóstico del derrame pleural maligno, pero su valor diagnóstico no está claro⁵⁰.

1.4.3. CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL DERRAME PLEURAL MALIGNO

La evaluación citológica de los derrames se realiza de forma rutinaria para detectar malignidad, sin embargo, un diagnóstico definitivo no siempre es posible solamente con la citología. Existen similitudes entre las células mesoteliales reactivas y las metástasis de adenocarcinoma que dificulta la diferenciación entre ambas⁵¹, por ello puede haber una mala interpretación entre dichas células que conlleva a la existencia de importantes falsos negativos para las células de adenocarcinoma en los derrames. Por lo tanto, hay una necesidad de métodos complementarios para identificar las células tumorales dentro de los derrames pleurales⁵².

La citometría de flujo es una técnica que permite un análisis rápido, preciso y reproducible de las células del líquido pleural, pudiendo complementar a la citología en el estudio de los derrames pleurales sospechosos de malignidad⁵³. Actualmente, se utiliza de rutina en los derrames de predominio linfocitario en los que se sospecha la existencia de linfoma¹⁵. El análisis celular por citometría de flujo tiene la ventaja de que puede estudiar tanto la expresión de diferentes marcadores en un gran número de células como la cantidad de ácido desoxirribonucleico (ADN) o el ciclo celular de las distintas células.

Se ha observado que el ADN aneuploide, con un número anormal de cromosomas, es común en los tumores malignos^{54, 55}, por este motivo, la citometría de flujo se ha utilizado para ver la aneuploidía del ADN en los derrames sospechosos de malignidad, pero su estudio ha mostrado una amplia variación en la sensibilidad y especificidad. Recientemente, se ha comparado el papel de la citometría de flujo en el ADN con el de la citomorfología observándose una mayor precisión en ésta última, por lo que sigue siendo el método de diagnóstico más importante en la detección de células malignas en los derrames, mientras que el ADN sólo ocupan un valor complementario⁵⁶.

Debido a que el diagnóstico del derrame pleural maligno es crucial, ya que podría ser la primera presentación del cáncer, y que con frecuencia se acompaña de un mal pronóstico sería muy útil poder identificar marcadores que permitan confirmar o aumentar la posibilidad diagnóstica de la malignidad del derrame con el objetivo de iniciar intervenciones terapéuticas más precozmente y así, reducir la morbimortalidad de los pacientes.

1.5. DERRAME PLEURAL Y CÉLULAS NATURAL KILLER

Los derrames pleurales malignos se caracterizan por un elevado porcentaje de células mononucleares implicadas en los mecanismos de defensa, siendo las células natural killer (NK) y los linfocitos T los principales componentes del sistema inmunológico humano que participan en esta defensa tumoral⁵⁷.

1.5.1. LINFOCITOS T

Los linfocitos T presentan un receptor de membrana homólogo a las inmunoglobulinas (Ig) conocido como TCR (receptor de células T), mediante el cual son capaces de identificar al antígeno presentado por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Además, los linfocitos T expresan una gran diversidad de receptores para antígeno capaces de reconocer una amplia variedad de sustancias extrañas. En cualquier sujeto, puede haber 10⁷ o más clones diferentes de linfocitos T y cada uno con un receptor único⁵⁸. Por lo tanto, los linfocitos T son un grupo muy heterogéneo de células que comparten una característica biológica esencial, la expresión en membrana plasmática del TCR, así mismo, éste consta de dos cadenas que forman el sitio de unión al antígeno diferenciando dos tipos de linfocitos T atendiendo a la pareja de cadenas que forman su TCR: los linfocitos T $\alpha\beta$ y los linfocitos T $\gamma\delta$. Ambos comparten un grupo de proteínas que se asocian al TCR y se denominan

CD3, formando parte del complejo TCR/CD3, por ello, el marcador CD3 identifica por definición a todos los linfocitos T. Las principales funciones de los linfocitos T son erradicar las infecciones producidas por microbios intracelulares y activar otras células como macrófagos y linfocitos B, pero su función depende de su capacidad para reconocer células infectadas por agentes patógenos. Para poder llevarla a cabo, reconocen los fragmentos peptídicos de proteínas en forma de complejos de péptido y moléculas MHC en la superficie de esas células. Así, las células infectadas por virus o bacterias que viven en el citosol y las células tumorales con antígenos modificados son eliminadas por los linfocitos T citotóxicos presentadas por moléculas MHC de clase I.

En la defensa tumoral, el papel de las células natural killer es más específico que el de los linfocitos T porque no sólo son capaces de eliminar las células neoplásicas cuando las presentan las MHC, sino también de forma espontánea, es decir, sin inmunización previa. Además, las células NK pueden llevar a cabo reacciones de citotoxicidad dependiente de anticuerpo. Por ello, aunque los linfocitos T también participan en esta defensa tumoral, hemos centrado nuestra atención en el estudio de las células natural killer.

1.5.2. CÉLULAS NATURAL KILLER

Las células natural killer fueron descritas por primera vez en la década de los setenta y representan uno de los componentes celulares especializados más relevantes de nuestro sistema inmune innato, caracterizándose por presentar capacidades citotóxicas e inmunorreguladoras. Están implicadas en la primera línea de defensa frente a infecciones víricas y células neoplásicas. Décadas atrás, el origen y papel de esta estirpe celular fue ampliamente discutido, sin embargo, en la actualidad está perfectamente establecido que se trata de una clase de linfocito, ya que proceden de la diferenciación a partir de precursores

presentes en la línea linfoide, que a su vez procede de las células madres CD34+ capaces de diferenciar la mayoría de las células que componen nuestro sistema inmune⁵⁹.

Morfológicamente, estas células han sido definidas como linfocitos granulares grandes, debido a su mayor tamaño respecto a los linfocitos T, con los cuales comparten receptores de superficie y funciones. De manera similar, son capaces de secretar citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias, y presentan mecanismos efectores comunes que incluyen la liberación de moléculas citotóxicas como las granzimas y las perforinas o la expresión del receptor de superficie CD95 (FAS), capaz de inducir la apoptosis celular en células diana. Sin embargo, las células NK presentan importantes diferencias respecto de los linfocitos T. Por un lado, no expresan el TCR ni realizan la recombinación somática (sintetizan CD3, pero no lo expresan en superficie), y por otro, no necesitan la maduración en el timo, imprescindible para el desarrollo de los linfocitos T⁶⁰.

Estas células se encuentran mayoritariamente en sangre periférica, donde constituyen alrededor del 10% de la población linfoide, pero también existen células NK residentes en tejidos. En general, constituyen poblaciones minoritarias en la pulpa roja del bazo, en las regiones sinusoidales del hígado o intestino y en los ganglios linfoides. En procesos inflamatorios esta situación cambia ya que las células NK, predominantes en sangre periférica, van a migrar a los diferentes tejidos para poder ejercer su función en respuesta a la inflamación causada por los patógenos o por las células tumorales.

1.5.2.1. SUBPOBLACIONES DE LAS CÉLULAS NATURAL KILLER

Como se ha comentado previamente, las células NK representan una subpoblación de linfocitos que se caracterizan por carecer de TCR,

inmunoglobulina de superficie y expresión del antígeno CD3, pero tienen receptores de baja afinidad para el fragmento Fc de la IgG (FcγRIII, CD16) y **expresan en su superficie la molécula CD56⁶¹**.

Definir las subpoblaciones de células NK en función de la expresión de sus receptores es muy complicado y, por lo tanto, las deberíamos definir como células heterogéneas. Sin embargo, durante años se han identificado clases de células NK dependiendo de las funciones que eran capaces de realizar. De esta manera, se establecen las subpoblaciones atendiendo a la intensidad de expresión de los antígenos de superficie **CD56 y CD16**.

Según la intensidad de expresión del antígeno de superficie **CD56** podemos clasificar a las células NK en reguladoras y citotóxicas.

- Si tienen un alto número de moléculas en su membrana expresarán el antígeno de superficie CD56 con mayor intensidad, por lo que serán células **NK CD56 bright** (brillante). Esta subpoblación, aunque representa un 10% de las NK circulantes en sangre, es más abundante en otros tejidos como el líquido pleural^{62, 63, 64}. Se les denomina **NK reguladoras** por su alta capacidad de producción de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias⁶⁵, como interferón (IFN) γ , factor de necrosis tumoral (TNF) β , interleuquina (IL)-10, IL-13 y factor estimulante de colonias de granulocito-macrófago (GM-CSF). Se ha descrito un aumento de CD56 bright en diferentes enfermedades como infecciones respiratorias crónicas y bronquiectasias y en infectados por virus de la hepatitis C o con mantoux positivo.
- Si el número de moléculas en su membrana es bajo expresarán el antígeno de superficie CD56 con menor intensidad y se denominarán células **NK CD56 dim** (débil)⁶⁶ o **citotóxicas**. Predominan en sangre periférica en un 90% y tienen una alta actividad lítica, además expresan

en alta densidad receptores que potencian su capacidad de responder frente a células anormales. **Si se acompañan de una alta expresión de CD16**, las hace eficientes mediadores de la **citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo**, ya que un potente **receptor activador** es el receptor Fc γ , CD16.

Según la expresión de los antígenos de superficie **CD56** y **CD16** podemos clasificar las NK en las siguientes subpoblaciones⁶⁵:

- **NK CD56 bright CD16-** (50-70% de las NK CD56 bright). En su membrana hay un alto número de moléculas que expresan el antígeno de superficie CD56 pero no hay moléculas que expresen el CD16.
- **NK CD56 bright CD16+** (30-50% de las NK CD56 bright). En esta subpoblación, además de haber un alto número de moléculas en su membrana que expresan el antígeno CD56 también hay moléculas que expresan el antígeno de superficie CD16.
- **NK CD56 dim CD16-**. Se caracterizan por tener en su membrana un número bajo de moléculas que expresan CD56 y no disponer de moléculas para el antígeno CD16.
- **NK CD56 dim CD16+**. Las células NK con esta expresión, bajo número de moléculas que expresan CD56 y moléculas en su superficie para el CD16, son más citotóxicas que las subpoblaciones anteriores.

Aunque la expresión **CD57** fue identificada en los linfocitos T CD8⁺⁶⁷, estudios más recientes han establecido que también puede ser un marcador de las células NK⁶⁸. Así mismo, **se ha correlacionado con la subpoblación de NK CD56 dim y con una mayor expresión de CD16**⁶⁹ por lo que CD57 parece identificar las etapas finales de maduración de las células NK periféricas. Funcionalmente, en comparación con las células CD57-, tienen menos capacidad de respuesta a las citoquinas y más a la señalización a través de CD16⁶⁹. Por lo tanto, CD57 es

un marcador muy útil de maduración de las células NK y de identificación de células con **potente potencial citotóxico** pero con disminución de la sensibilidad a las citoquinas. Además como con la edad se modifica el número de células NK circulantes, se objetiva un aumento de las subpoblaciones CD57+ y CD16+⁷⁰ junto a una disminución de las células CD56 bright⁷¹.

Tabla 1.2. Subpoblaciones y funciones de las células NK.

Células NK (CD3- CD56+)	Reguladoras	Subpoblaciones	Función
	NK CD56 bright (CD3- CD56++)		CD56 bright CD16-
		CD56 bright CD16+	Mixta
Células NK (CD3- CD56+)	Citotóxicas	Subpoblaciones	Función
	NK CD56 dim (CD3- CD56+)		CD56 dim CD16-
		CD56 dim CD16+	Citotóxica
	NK CD16+ (CD3- CD56+/++ CD16+)		Principalmente citotóxica
	NK CD57+ (CD3-CD56+/++ CD57+)		Principalmente citotóxica

1.5.2.2. FUNCIONES DE LAS CÉLULAS NATURAL KILLER

Este tipo celular fue definido como natural killer (asesinas natas) por ser capaces de eliminar células tumorales de forma espontánea sin inmunización previa, es decir, células cuyo papel no estaba restringido por la presentación antigénica en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad funcionando como efectoras de la inmunidad innata. Además, una vez que en el organismo ha desarrollado una respuesta específica humoral, las células NK pueden llevar

a cabo reacciones de citotoxicidad dependiente de anticuerpo, por lo que también funcionan como células efectoras de la inmunidad adquirida. Se caracterizan por una potente capacidad citolítica y un sistema extremadamente eficiente para inducir apoptosis en las células diana. Se ha comprobado que producen citoquinas que regulan la respuesta inmune natural y adquirida y que están implicadas en el reconocimiento materno-fetal durante el embarazo⁷². También, al diferenciar entre células autólogas y heterólogas, contribuyen al rechazo de los trasplantes⁷³.

Es muy relevante la cooperación que existe entre las células NK y las otras células del sistema inmune innato como las células dendríticas o del sistema inmune adaptativo como los linfocitos T. En este sentido, las citoquinas IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18 junto con los interferones α y β , liberadas por células centinela, como los macrófagos o las células dendríticas, activan a las células NK. Como consecuencia, las NK producen, además el IFN γ , el TNF α , el GM-CSF y grandes cantidades de quimioquinas, que a su vez, presentan una regulación autocrina mejorando sus funciones efectoras citotóxicas y reguladoras.

Por lo tanto, la capacidad citotóxica de las células NK se ha determinado en función de:

1. Su capacidad espontánea de lisar células que no expresan moléculas de histocompatibilidad de clase I o denominada **citotoxicidad espontánea o natural**.
2. Su capacidad inducida mediante la estimulación con citoquinas de lisar células que expresan moléculas de histocompatibilidad de clase I, también llamada **citotoxicidad inducida**.

3. Su capacidad de lisar mediante el reconocimiento de células por inmunoglobulinas IgG, las cuales se unirán a los receptores CD16 en el proceso denominado **citotoxicidad dependiente de anticuerpo**.

Alteraciones en el número o función de las células NK son responsables de numerosas patologías en los ámbitos de las infecciones, los tumores, la autoinmunidad y las inmunodeficiencias.

El hecho de que las NK sean capaces de eliminar células tumorales sin un reconocimiento específico del antígeno, las hace potencialmente útiles para su uso clínico en la inmunoterapia del cáncer. Existen muchos estudios que demuestran el papel antineoplásico de las NK, sin embargo, los mecanismos por los cuales son capaces de reconocer a las células tumorales cuando empiezan a malignizarse no son todavía bien conocidos. Hasta ahora, los ensayos clínicos basados en estos efectos antitumorales no han tenido éxito, pero el nuevo conocimiento sobre los receptores de estas células, la naturaleza de sus ligandos y el conocimiento de su distribución en células normales y tumorales, permitirá desarrollar aplicaciones clínicas para manipular las interacciones ligando/receptor en beneficio del paciente.

Puesto que la principal función de las células NK es la de identificar y destruir las células tumorales diana, teóricamente, la determinación de un elevado porcentaje de células NK en los derrames pleurales mediante citometría de flujo, podría ayudar a establecer la naturaleza tumoral del derrame. No obstante, la cuantificación de las NK en los derrames pleurales, sean malignos o benignos, ha dado resultados contradictorios en estudios previos: unos observan un aumento del porcentaje de células NK en derrame pleural maligno^{74, 75, 76}, otros disminución⁷⁷, e incluso algunos grupos no hallaron diferencias estadísticamente significativas entre derrames benignos y malignos⁷⁸.

Tampoco está claro el papel de las NK en los diferentes tumores. Hay estudios que demuestran que el porcentaje de células NK está aumentado en los

derrames metastásicos por adenocarcinoma⁷⁶, en contraste con los derrames por mesotelioma, linfoma y leucemias en los que está disminuido⁷⁴. Con estos resultados proponen que su determinación también podría ser útil en el diagnóstico diferencial entre adenocarcinoma y mesotelioma.

1.5.2.3. RECEPTORES Y LIGANDOS

Las funciones de las células NK van a ser determinadas por una compleja interacción entre los ligandos y un conjunto de receptores activadores e inhibidores que darán lugar a la correspondiente inhibición o activación de estas células, induciendo una adecuada respuesta protectora en nuestro organismo. Las células NK han demostrado presentar diferentes mecanismos que les permiten responder eficientemente ante una gran variedad de situaciones infecciosas o neoplásicas. Estos mecanismos están basados en la expresión genética de una amplia diversidad de receptores, que junto con la expresión exclusiva de algunos de ellos por ciertas subpoblaciones de células NK y asociada a la variedad genética intrínseca a los humanos, da lugar a un eficiente pero heterogéneo compartimento NK.

Tradicionalmente, los receptores de las células NK se han clasificado en dos grandes grupos en función de si eran activadores o inhibidores.

1) Receptores inhibidores. Son un grupo heterogéneo de glicoproteínas que pertenecen a distintas familias de moléculas que se expresan en las células NK y en algunos linfocitos T activados. Su función es reconocer específicamente las moléculas del MHC de clase I y discriminar entre células normales y células que han perdido la expresión de uno o más alelos del MHC de clase I. Según la teoría de la pérdida de lo propio, como consecuencia de este reconocimiento se produciría la inhibición de su actividad lítica y sólo cuando las células tengan una expresión deficiente del MHC de clase I serán destruidas por las células NK ejerciendo su acción efectora citotóxica.

La gran mayoría de estos receptores pertenecen a dos grandes superfamilias estructuralmente diferenciadas: la superfamilia de las inmunoglobulinas (**Ig-SF**) y la superfamilia de las lectinas dependientes de calcio (**tipo C**).

2) **Receptores activadores.** Son los que participan en la activación de las células NK tras el reconocimiento del MHC de clase I expresado en la célula diana. Entre los receptores responsables de la activación de las células NK, hay que destacar el **CD16, responsable de la citotoxicidad dependiente de anticuerpo y los receptores de citotoxicidad natural (NCR).**

Los NCR son el NKp46, el NKp44 y el NKp30⁷⁹. Su característica fundamental es que se expresan selectivamente por las células NK, y por lo tanto, representan los marcadores de superficie más fiables de éstas⁸⁰. La relevancia de este hallazgo es que ninguno de los marcadores disponibles hasta el momento es realmente NK específico mientras que estos sí lo son, además con importantes diferencias identificativas del estado de activación de las NK: mientras el NKp46 y el NKp30 permiten una identificación precisa de todas las células NK, independientemente de si están en reposo o activas, el NKp44 se expresa selectivamente por la activación de las células NK⁸⁰ y, a diferencia de otros marcadores de activación, está ausente en las células T activadas. Por lo tanto, NKp44 es un marcador específico de célula NK activada. Por esta especificidad, la familia de los NCR son considerados los prototipos y los receptores más importantes de la defensa antitumoral, aunque muchos de sus ligandos presentes en las células neoplásicas permanecen desconocidos, junto con su mecanismo de acción.

No existe en la actualidad ningún estudio que haya evaluado el desequilibrio o alteración de la actividad citotóxica de las NK mediada por los receptores de citotoxicidad natural en los derrames pleurales malignos comparado con benignos.

En resumen:

El derrame pleural maligno es un problema clínico común en los pacientes con enfermedad neoplásica y su aparición es un signo de enfermedad avanzada ya que implica la afectación del espacio pleural por parte de dicho proceso maligno.

La citometría de flujo es una técnica que permite un análisis rápido, preciso y reproducible de las células del líquido pleural, pudiendo complementar a la citología en el estudio de los derrames pleurales sospechosos de malignidad⁵³.

Las células NK están en la primera línea de defensa tumoral, por lo que la determinación de las subpoblaciones de NK, especialmente las que tienen función citotóxica (NK CD56dim CD16-, NK CD56 dim CD16+, NK CD16+ y NK CD57+), en los derrames pleurales podría ayudar a establecer tanto la naturaleza neoplásica del derrame como el pronóstico de los pacientes con derrame pleural maligno.

Entre los receptores responsables de la activación de las células NK destacan el CD16, responsable de la citotoxicidad dependiente de anticuerpo, y el NKp44 que expresa selectivamente la activación de las células NK⁸⁰. Por ello, el reconocimiento de las células NK activadas con la expresión de estos receptores podría orientarnos sobre la respuesta que tienen las NK frente a las células tumorales presentes en los derrames pleurales.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis, por tanto, es que el estudio de los diferentes fenotipos celulares presentes en el líquido pleural determinados mediante citometría de flujo, especialmente el estudio de las células NK, sus subpoblaciones y el receptor NKp44 como expresión de actividad celular, ayudaría al diagnóstico del derrame pleural maligno y podría ser un factor determinante en su pronóstico.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. OBJETIVOS PRINCIPALES

1. Establecer la utilidad de cuantificar las poblaciones linfocitarias, especialmente las células NK, en los derrames pleurales de etiología desconocida como posible indicador de malignidad (diferenciar entre malignos y benignos).
2. Evaluar el papel de las subpoblaciones de NK, principalmente las que tienen función citotóxica (NK CD56dim CD16-, NK CD56 dim CD16+, NK CD16+ y NK CD57+), en el diagnóstico del derrame pleural maligno.
3. Estudiar la aportación al diagnóstico de derrame pleural maligno del análisis de la ratio líquido pleural/sangre periférica (LP/SP), empleada habitualmente en el estudio de los derrames pleurales, de las poblaciones de NK.
4. Analizar el valor que NKp44 pudiera tener como biomarcador de malignidad del derrame pleural.

2.2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Evaluar si el estudio de NK, sus subpoblaciones y el del receptor NKp44 influyen en el pronóstico del paciente con derrame pleural maligno.
2. Evaluar si el estudio de la celularidad del líquido pleural combinado con las variables clínicas, radiológicas y analíticas también podría ser útil para ayudar a establecer el diagnóstico y/o pronóstico del derrame pleural.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio cohorte observacional prospectivo de dos años de duración incluyendo pacientes que tienen derrame pleural de etiología desconocida que van a ser sometidos a una toracocentesis diagnóstica como un procedimiento incluido en el manejo habitual del paciente.

3.2. EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ÉTICOS

La evaluación de los aspectos éticos ha sido en el Hospital donde se ha desarrollado la investigación. Este estudio se evaluó y aprobó el 29 de febrero de 2012 por el Comité de Ética y Ensayos Clínicos (CEIC) del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia y a la autorización correspondiente del responsable del Centro (Director Gerente), con código CEIC: 10/12.

Se ha informado al paciente por escrito de la naturaleza y propósitos del estudio y se ha obtenido su consentimiento informado (Anexo 1).

Los derechos de los pacientes han estado en todo momento protegidos por la declaración de Helsinki.

3.3. SELECCIÓN DE COHORTE

Estudio prospectivo de pacientes que tienen derrame pleural de etiología desconocida, pertenecientes al Departamento de Salud Valencia-Hospital Universitario Dr. Peset con un área de cobertura de 368.637 habitantes⁸¹.

En este trabajo hemos incluido consecutivamente a los pacientes que cumplían todos los siguientes criterios de inclusión y ninguno de exclusión.

Criterios de inclusión:

1. Pacientes con derrame pleural de etiología desconocida
2. Edad superior a 18 años.
3. Información al paciente y firma del Documento de Consentimiento Informado (Anexo 1)

Criterios de exclusión:

1. Negativa del paciente para participar en el estudio.
2. Contraindicación absoluta para realizar toracocentesis diagnóstica o biopsia pleural según la Normativa SEPAR (Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica)⁸².
3. Infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).
4. Comorbilidad grave que impida, condicione o desaconseje el estudio del derrame pleural mediante técnicas invasoras (toracocentesis y biopsia pleural).

3.4. METODOLOGÍA

- **Ámbito de estudio:** Hospital Universitario Dr. Peset, Servicio de Neumología.
- **Duración del reclutamiento:** Dos años (desde Enero de 2013 a Febrero de 2015)
- **Selección de cohorte:** Pacientes con derrame pleural de etiología desconocida.
- **Tasa de participación:** 100%

Tras el diagnóstico de derrame pleural mediante radiografía de tórax y firma del consentimiento informado, se ha realizado la recogida de:

- Datos demográficos, comorbilidades, hábitos tóxicos, posible exposición laboral predisponente, antecedentes familiares y personales de cáncer, contacto con tuberculosis y si se ha vacunado de la gripe ese año. Se preguntó específicamente sobre la vacunación antigripal porque las moléculas NKp46 y NKp44 son específicas para hemaglutininas de los virus Influenza⁷³.

- Datos clínicos del episodio

- Hallazgos radiográficos iniciales

- Datos analíticos de la sangre periférica extraída el mismo día de realización de la primera toracocentesis diagnóstica (hemograma, bioquímica, estudio de coagulación y de poblaciones linfocitarias, cuantificación porcentual respecto al 100% de los linfocitos totales, así como la determinación de las subpoblaciones de NK y del receptor de citotoxicidad natural NKp44 respecto al porcentaje de las células NK totales mediante citometría de flujo).

- Serología de VIH. Realizada para confirmar que el paciente no está infectado por VIH, ya que esta infección puede interferir en la función que ejercen las NK frente a las células tumorales⁶⁰.

- Toracocentesis diagnóstica para estudio de líquido pleural: análisis bioquímico, microbiológico, citológico y recuento celular. Se establecerá el diagnóstico de trasudado o exudado mediante los criterios de Light²⁹.

- Se ha realizado una cuantificación porcentual de las poblaciones linfocitarias en líquido pleural respecto al 100% de los linfocitos totales mediante citometría de flujo, también se han contabilizado los porcentajes respecto a las NK totales de las subpoblaciones de NK utilizando los marcadores de antígenos de superficie CD3, CD56, CD16 y CD57 así como del

receptor de citotoxicidad natural NKp44 (CD336) en el líquido pleural obtenido en la primera toracocentesis diagnóstica realizada al paciente para evitar las posibles modificaciones en la concentración de estas células durante la evolución de la enfermedad.

Según el diagnóstico final del derrame pleural se han clasificado los pacientes en tres grupos bien diferenciados: malignos, paramalignos y benignos.

- Se considera **derrame pleural maligno** si se confirma la presencia de células tumorales en la cavidad pleural¹⁵ mediante estudio citológico del líquido pleural, o en tejido pleural obtenido por biopsia pleural de manera ciega, toracoscopia o toracotomía.

- **Derrame pleural paramaligno** es aquel que es debido a un proceso tumoral pero sin infiltración pleural directa por el tumor, no se puede demostrar células tumorales ni en el líquido ni en el tejido pleural.

- Se considera **benigno** todo derrame pleural, diagnosticado de tal o inespecífico, en el que se ha descartado razonablemente (por técnicas de imagen / exploraciones previas / historia clínica y seguimiento del paciente) una etiología tumoral.

Se ha realizado un seguimiento prospectivo de la evolución de los pacientes hasta el éxitus o fin del estudio. Para ello, se han revisado las historias clínicas a través del programa informático intrahospitalario Orion Clinic o se han realizado consultas telefónicas a los pacientes y/o familiares si la información no estaba disponible en este sistema de información hospitalaria.

3.5. PROCESADO DE LAS MUESTRAS

La determinación de los antígenos por citometría de flujo se ha realizado mediante la técnica habitual de marcado de antígenos de superficie con

anticuerpos monoclonales comerciales. Brevemente, se basa en la incubación de la muestra con anticuerpos monoclonales realizando previamente un proceso de lisis de hematíes y su procesamiento en una suspensión líquida (PBS, phosphate buffered saline). No se precisan técnicas de marcaje intracitoplasmático. Antes del procesamiento de la muestra se ha realizado una filtración para eliminación de partículas sólidas y una citocentrifugación para concentrar la celularidad existente.

3.5.1. MARCADO DE ANTÍGENOS EN SANGRE PERIFÉRICA

Tras la extracción, inmediatamente se realiza la homogeneización de la sangre periférica mediante el agitador y mezclador The Coulter Mixer (Coulter Electronics Limited, Northwell Drive, Luton, Bedfordshire, LU3 3RH, England[®]). A continuación, en un tubo de polipropileno se introducen 100µl de muestra con 10µl de cada uno de los anticuerpos monoclonales elegidos: CD45 (específico de leucocitos), CD19 (de linfocitos B), CD3 (de linfocitos T), CD56 (de NK), CD16 y CD57 (de subpoblaciones de NK) y CD336 (de NKp44), que se incubarán durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se añaden 0,5ml de solución lisante de hematíes (OptiLyse[®]), se agita con vórtex (Super-Mixer, Lab-Line Instruments Inc.[®]) y se vuelve a incubar a temperatura ambiente y en oscuridad otros 15 minutos. Tras la incubación, se añaden 2ml de PBS, se centrifuga a 300 x g (~1600 r.p.m.) en Microcen 21[®] durante 5 minutos y finalmente, se decantan los sobrenadantes y se resuspenden las células en 1ml de PBS introduciéndose en el citómetro de flujo.

3.5.2. MARCADO DE ANTÍGENOS EN LÍQUIDO PLEURAL

Al igual que en la sangre periférica, el marcado de antígenos de superficie en el líquido pleural requiere homogeneizar la muestra tras la extracción, pero previamente a la incubación de los 100µl de líquido pleural con los 10µl de los anticuerpos monoclonales elegidos: CD45 (específico de leucocitos), CD19 (de linfocitos B), CD3 (de linfocitos T), CD56 (de NK), CD16 y CD57 (de subpoblaciones de NK) y CD336 (de NKp44), se debe enriquecer la misma. Para ello, en 2ml de líquido pleural se añaden 2ml de PBS, se agita y se centrifuga a 300 x g (~1600 r.p.m.) en Microcen 21[®] durante 5 minutos. Posteriormente, se decantan los sobrenadantes y se resuspenden las células en 0,5ml de PBS. Tras este proceso, ya se puede proceder a la incubación con los anticuerpos monoclonales siguiendo los mismos pasos que en la sangre periférica.

La suspensión celular tanto de la sangre periférica como del líquido pleural se ha analizado en un citómetro de flujo Navios[®] (Beckman-Coulter).

3.6. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Todas las muestras de líquido pleural y sangre periférica se han procesado y analizado de acuerdo con el protocolo previamente establecido. Así mismo, se realizó un análisis a ciegas, es decir la hematóloga que realizó el análisis de todas las muestras no sabía el diagnóstico de presunción ni el definitivo de ninguno de los pacientes. Dicho análisis se llevó a cabo con el software Kaluza 1.3 de Beckman Coulter.

La técnica permite la detección de subpoblaciones de un fenotipo determinado con una sensibilidad de 10^{-2} - 10^{-3} (reconocimiento de una célula entre 100 - 1000), aunque depende de la celularidad presente en la muestra.

La positividad o negatividad de expresión de un determinado antígeno se ha realizado mediante la valoración habitual en citometría de flujo, que considera positiva la señal eléctrica superior a una primera década logarítmica en histogramas de doble parámetro o en diagramas de puntos (figura 3.1).

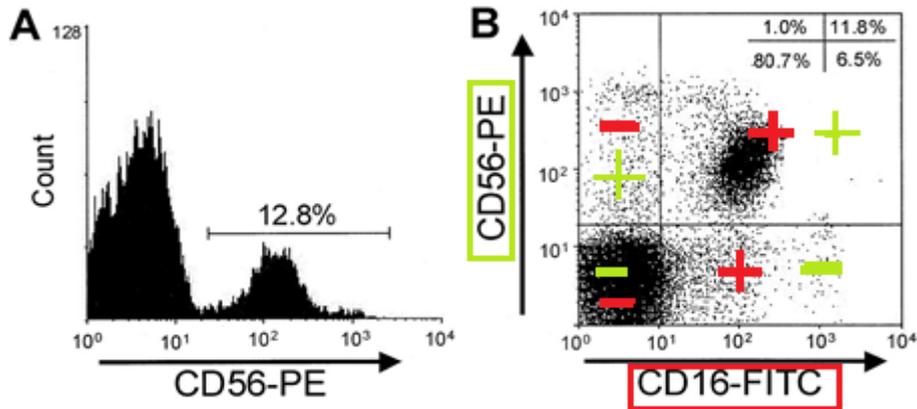


Figura 3.1. Modificado de Cooper y colaboradores⁸³. Histograma de doble parámetro y diagrama de puntos. A: Histograma, el eje de abscisas representa la intensidad de expresión de CD56 y el eje de ordenadas el número de células con cada nivel de fluorescencia. B: Diagrama de puntos. Indica la positividad o negatividad de expresión de un antígeno, su intensidad y la cantidad de células, cada punto representa una célula.

En primer lugar, tras la expresión de CD45 (antígeno común de leucocitos), se han estudiado las poblaciones linfocitarias determinando los linfocitos B (CD19+ CD3-), los linfocitos T (CD3+ CD19-), y las células NK (aquellas con características morfológicas de linfocitos que expresan el antígeno CD56 pero no el CD3 en la superficie celular), cuyos resultados se han expresado en porcentaje en relación al número de linfocitos totales de la muestra (figura 3.2).

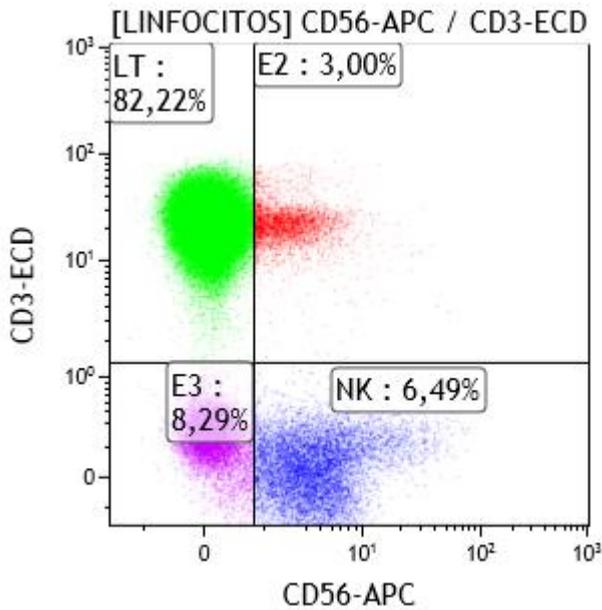


Figura 3.2. Representación gráfica de linfocitos T y células NK en líquido pleural de uno de nuestros pacientes con derrame pleural maligno. LT: Linfocitos T, verde, (CD3+ CD56-), NK: natural killer, azul, (CD56+ CD3-).

Posteriormente, atendiendo a la intensidad de expresión de los antígenos de superficie CD56 y CD16 hemos analizado las subpoblaciones de NK. Si tienen alto número de moléculas en su membrana expresarán el antígeno de superficie CD56 con mayor intensidad, por lo que serán células NK CD56 bright (brillante), si el número es bajo lo expresarán con menor intensidad y se denominarán células NK CD56 dim (débil)⁶⁶ (figuras 3.3 A y B).

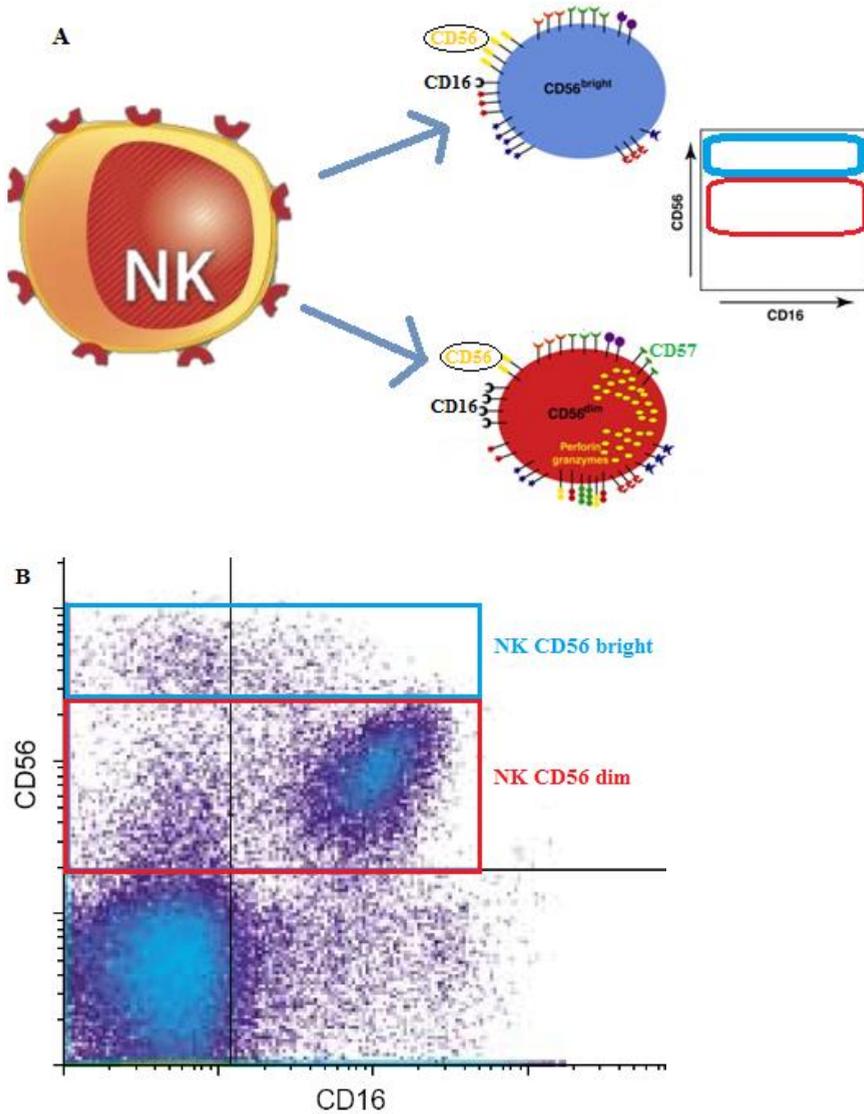


Figura 3.3. Representación de NK CD56 bright y NK CD56 dim. A y B: Se observa como NK CD56 bright (azul), que tiene un alto número de moléculas en su superficie, y NK CD56 dim (roja), con menos moléculas, se representan en un diagrama de puntos. B: Modificado de Cooper MA et al⁸³.

Así mismo, en función de la expresión del antígeno de superficie CD16, diferenciaremos cuatro subpoblaciones de NK: las NK CD56 bright CD16-, NK

CD56 bright CD16+, NK CD56 dim CD16- y las NK CD56 dim CD16+⁶⁵ (figura 3.4 A, B y C). También se ha determinado la expresión del antígeno CD57+ por ser un marcador de identificación de células con potente potencial citotóxico (figura 3.4 A y 3.5).

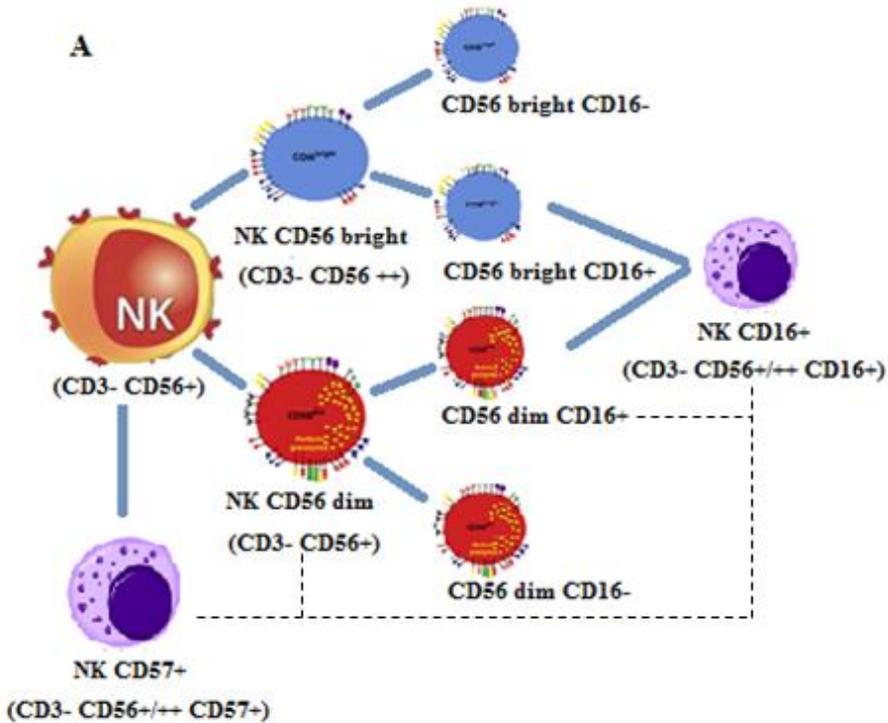


Figura 3.4.A. Representación de las subpoblaciones de NK. Se observan las subpoblaciones de NK atendiendo a la intensidad de expresión de los antígenos de superficie CD56 y CD16. Así como la expresión CD57+, que se ha correlacionado con la subpoblación de NK CD56 dim y con una mayor expresión de CD16 (representado en figura como línea discontinua), por lo que parece identificar las etapas finales de maduración de las células NK.

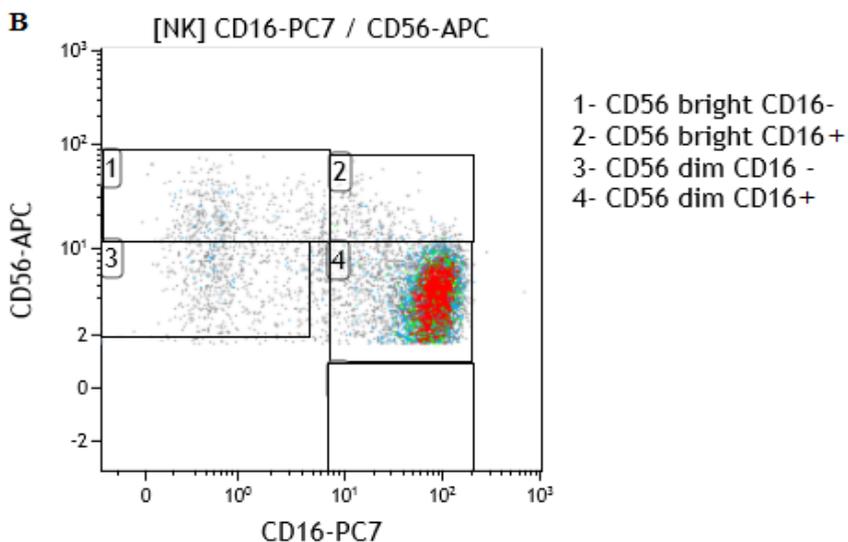


Figura 3.4.B. Ejemplo de diagrama de puntos de las subpoblaciones de NK en líquido pleural. Corresponde a uno de nuestros pacientes con derrame pleural maligno.

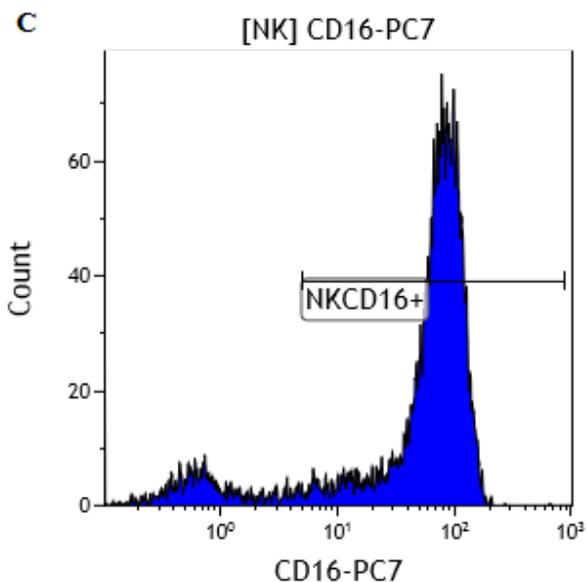


Figura 3.4.C: Ejemplo de histograma. Representa la subpoblación NK CD16+ en líquido pleural del paciente con derrame pleural maligno de la figura 3.4 B.

Finalmente, se ha estudiado específicamente la expresión del receptor de citotoxicidad natural NKp44 (CD336+). Los valores de las distintas subpoblaciones de NK y de este receptor se han expresado en porcentaje en relación a las células NK totales (figura 3.5).

Gate	%Total	%Gated	
CELULARIDAD	98,35	98,35	
 LINFOCITOS	58,68	59,67	
 LT	48,25	82,22	
 NK	3,81	6,49	1- CD56 bright CD16-
1	0,20	5,19	2- CD56 bright CD16+
2	0,12	3,21	3- CD56 dim CD16 -
3	0,25	6,64	4- CD56 dim CD16+
4	3,17	83,12	
NKCD16+	3,35	87,86	
NKCD336+	0,01	0,36	
NKCD57+	1,33	34,85	

Figura 3.5. Ejemplo de informe del análisis de uno de nuestros pacientes. Se observan los valores porcentuales en líquido pleural de los linfocitos totales, linfocitos T, células NK, subpoblaciones de NK y el receptor de citotoxicidad natural NKp44 (CD336+) del paciente de la figura 3.4 B y C.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.7.1. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

Teniendo en cuenta que el porcentaje de células NK en el derrame pleural maligno es del 22% y en el derrame pleural benigno es del 5% según la

literatura revisada, definimos la hipótesis para el cálculo del tamaño muestral como unilateral puesto que consideramos que el porcentaje de células NK presentes en el derrame pleural maligno debe ser mayor que en los derrames pleurales de otra etiología (no malignos), indicando por tanto una dirección de las diferencias. Teniendo en cuenta el efecto que se pretende conseguir (Error α 0.05; Error β 0.10) y considerando una pérdida del 15% de la cohorte, el número total estimado de pacientes necesarios sería 58.

3.7.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todos los datos se han analizado para estudiar si seguían una distribución normal utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov para una muestra. Las variables cualitativas se han expresado como valor absoluto y porcentaje, las continuas paramétricas como media \pm desviación estándar (DE) y las no paramétricas como mediana (mínimo y máximo).

3.7.2.1. ANÁLISIS UNIVARIADO

Se ha realizado un análisis estadístico univariado de las variables clínicas, radiológicas y analíticas recogidas, así como de los valores porcentuales de las poblaciones linfocitarias, subpoblaciones de NK y del receptor NKp44 en líquido pleural y sangre periférica. Se ha utilizado el test de chi-cuadrado para las variables cualitativas y el test T de student para muestras independientes y el de U de Mann-Withney, para las cuantitativas paramétricas y no paramétricas respectivamente. Para la comparación de más de dos grupos, se ha aplicado el test del análisis de la varianza (ANOVA) de una vía en las paramétricas, y la prueba de Kruskal-Wallis en las no paramétricas. En todos los resultados se ha calculado el intervalo de confianza (IC) del 95%.

En el estudio de las diferencias de las poblaciones linfocitarias, subpoblaciones de NK y del receptor NKp44 entre el líquido pleural y la sangre periférica se ha utilizado la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon o el test T de student para muestras apareadas según corresponda, y en el análisis de la correlación entre los valores porcentuales de los diferentes fenotipos celulares del líquido pleural y la sangre periférica, el coeficiente de correlación de Pearson.

Con la intención de mejorar el rendimiento diagnóstico del derrame pleural de etiología desconocida, hemos calculado la ratio LP/SP de los porcentajes de las poblaciones de NK y hemos analizado las diferencias entre los distintos grupos estudiados.

La eficacia diagnóstica del análisis de las células del líquido pleural y de la sangre periférica, así como de la ratio LP/SP que mostraron diferencias para discriminar entre derrame pleural maligno y benigno, se ha determinado mediante un análisis de curva COR (característica operativa del receptor) con cálculo de área bajo la curva.

Se ha estimado la supervivencia por el método de Kaplan-Meier y las curvas obtenidas en pacientes con derrame pleural maligno, paramaligno y benigno se han comparado mediante el test de rangos logarítmicos.

3.7.2.2. ANÁLISIS MULTIVARIADO

Para la identificación de los factores pronósticos de los pacientes con derrame pleural maligno, paramaligno o benigno se ha utilizado el modelo de regresión de Cox. En primer lugar, se ha realizado el análisis crudo (Hazard Ratio (HR) crudo), es decir para cada factor sin ajustar, de las diferentes poblaciones celulares estudiadas en líquido pleural y sangre periférica y de las ratios LP/SP de NK. A continuación, siguiendo una metodología paso a paso en la que las variables son seleccionadas con exclusión secuencial, se han calculado las Hazard Ratios con el IC del 95% mediante un análisis ajustado.

En la práctica clínica habitual, además del estudio de la celularidad, es necesario tanto en el diagnóstico como en el pronóstico del derrame pleural maligno las variables clínicas, radiológicas y analíticas. Por ello, hemos estudiado la implicación de todas estas variables con árboles de decisión mediante el método CHAID (Chi-square automatic interaction detector). La metodología CHAID permite la detección automática de interacciones mediante Chi-cuadrado, eligiendo en cada paso la variable independiente (predictora) que presenta la interacción más fuerte con la variable dependiente. Las categorías de cada predictor se funden si no son significativamente distintas respecto a la variable dependiente y el procedimiento excluirá de forma automática cualquier variable de las seleccionadas cuya contribución al modelo final no sea significativa, obteniendo un árbol de decisiones. Para la elección de las variables independientes se ha realizado una metodología paso a paso.

Se ha considerado significación estadística si $p < 0,05$.

Se ha utilizado el paquete estadístico IBM SPSS Statistics for Windows (versión 21.0. Armonk, New York: IBM Corp.) y el programa para el análisis epidemiológico de datos Epidat (versión 4.1, octubre 2014. Consejería de Sanidad, Junta de Galicia).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. DATOS GENERALES Y ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

En nuestro estudio se han analizado un total de setenta y tres pacientes con derrame pleural de etiología desconocida. Debido a que dos pacientes fueron excluidos al no obtener celularidad en el líquido pleural, la muestra final del estudio fue de setenta y un pacientes que cumplieron todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión. Según el diagnóstico final del derrame pleural se han diferenciado tres grupos (malignos, paramalignos y benignos) tal como muestra la figura 4.1.

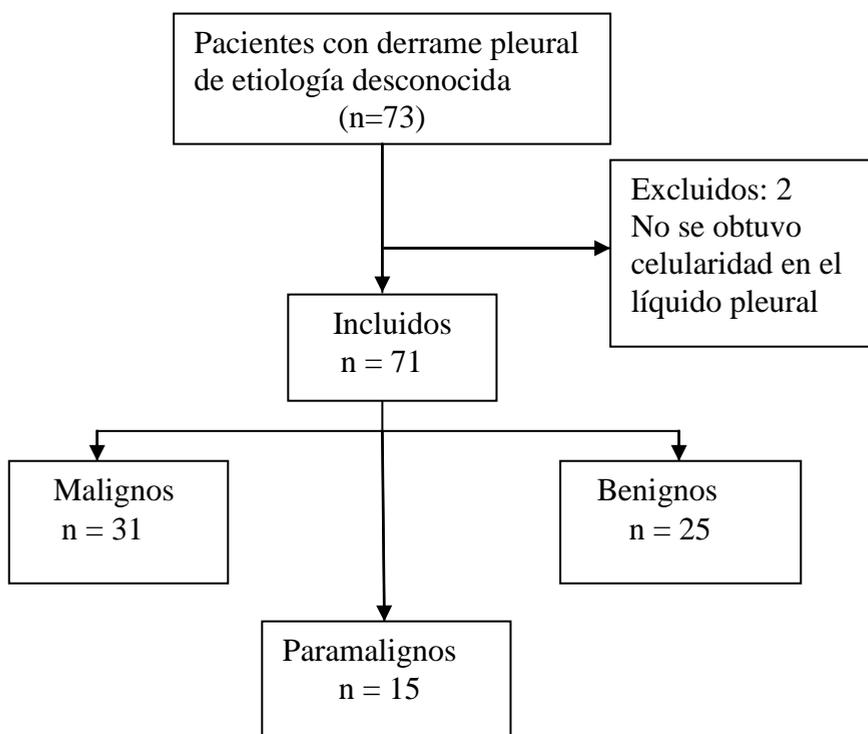


Figura 4.1. Flujo de pacientes incluidos en el estudio.

4.1.1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Nuestra población de estudio incluye un total de setenta y un pacientes que se han agrupado según el diagnóstico final del derrame pleural en:

- Malignos: 31 pacientes (43,7% del total)
- Paramalignos: 15 pacientes (21,1% del total)
- Benignos: 25 pacientes (35,2% del total)

Las características basales tanto del total de pacientes como de cada uno de los diferentes grupos se describirán a continuación.

4.1.1.1. EDAD Y SEXO DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

La edad media de la población de estudio es de 69,1 años, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre grupos. En relación al sexo, hay un claro predominio del masculino en los derrames malignos y paramalignos a diferencia de los benignos, en los que la mayoría son mujeres, sin llegar a alcanzar la significación estadística (tabla 4.1).

Tabla 4.1. Características basales de la población de estudio. Edad y sexo.

	Total (n=71)	Malignos (n=31)	Paramalignos (n=15)	Benignos (n=25)	Valor de p
Edad (años)	69,1 ± 10,5	69,2 ± 8,9	69,8 ± 11,1	68,7 ± 12,2	0,949
IC 95%	66,7-71,6	65,9-72,4	63,6-76	63,6-73,7	
Sexo					0,133
Masculino	43 (60,6%)	19 (61,3%)	12 (80%)	12 (48%)	
IC 95%	48,3-72	42,2-78,2	51,9-95,7	27,8-68,7	
Femenino	28 (39,4%)	12 (38,7%)	3 (20%)	13 (52%)	
IC 95%	28-51,8	21,9-57,8	4,3-48,1	31,3-72,2	

Datos expresados en valor absoluto y porcentaje o media ± DE. IC (intervalo de confianza). Test de chi-cuadrado y ANOVA. Fue significativo $p < 0,05$.

4.1.1.2. COMORBILIDADES DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

En torno al 34% de los pacientes están diagnosticados de alguna de las siguientes enfermedades respiratorias crónicas: la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), el asma, las bronquiectasias o la enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID), siendo la EPOC la enfermedad respiratoria crónica más frecuente en todos los grupos, significativamente mayor en el grupo de paramalignos. No hay diferencias significativas en el resto de las comorbilidades (tabla 4.2 y 4.3).

Tabla 4.2. Características basales de la población de estudio. Comorbilidades.

	Total (n=71)	Malignos (n=31)	Paramalignos (n=15)	Benignos (n=25)	Valor de p
E. respiratoria crónica	24 (33,8%)	12 (38,7%)	7 (46,7%)	5 (20%)	0,168
IC 95%	23-46	21,9-57,8	21,2-73,4	6,8-40,7	
EPOC	17 (70,8%)	8 (66,7%)	7 (100%)	2 (40%)	0,020
IC 95%	14,6-35,6	11,9-44,6	21,2-73,4	1-26	
Asma/Rinitis	4 (16,7%)	3 (25%)		1 (20%)	0,373
IC 95%	1,6-13,8	2-25,8		0,1-20,4	
Bronquiectasias	1 (4,2%)			1 (20%)	0,393
IC 95%	0-7,6			0,1-20,4	
EPID	2 (8,3%)	1 (8,3%)		1 (20%)	0,748
IC 95%	0,3-9,8	0,1-16,7		0,1-20,4	
Neumonías previas	4 (5,6%)	3 (9,7%)		1 (4%)	0,373
IC 95%	1,6-13,8	2-25,8		0,1-20,4	
TEP	1 (1,4%)	1 (3,2%)			0,520
IC 95%	0-7,6	0,1-16,7			
Traumatismo	1 (1,4%)	1 (3,2%)			0,520
IC 95%	0-7,6	0,1-16,7			
Radioterapia	1 (1,4%)	1 (3,2%)			0,520
IC 95%	0-7,6	0,1-16,7			

Datos expresados en valor absoluto y porcentaje. E. (enfermedad), TEP (tromboembolismo pulmonar), IC (intervalo de confianza). Test de chi-cuadrado. Fue significativo $p < 0,05$.

Tabla 4.3. Características basales de la población de estudio. Comorbilidades.

	Total (n=71)	Malignos (n=31)	Paramalignos (n=15)	Benignos (n=25)	Valor de p
VHC	1 (1,4%)			1 (4%)	0,393
IC 95%	0-7,6			0,1-20,3	
E. Coronaria	10 (14,1%)	6 (19,4%)	2 (13,3%)	2 (8%)	0,476
IC 95%	7-24,4	7,5-37,5	1,7-40,5	1-26	
DM	20 (28,2%)	8 (25,8%)	5 (33,3%)	7 (28%)	0,868
IC 95%	18,1-40,1	11,9-44,6	11,8-61,6	12,1-49,4	
I. cardiaca	8 (11,3%)	4 (12,9%)		4 (16%)	0,280
IC 95%	5-21	3,6-29,8		4,5-36,1	
I. renal	8 (11,3%)	2 (6,5%)	1 (6,7%)	5 (20%)	0,230
IC 95%	5-21	0,8-21,4	0,2-32	6,8-40,7	
Hepatopatía	2 (2,8%)			2 (8%)	0,151
IC 95%	0,3-9,8			1-26	
E. Pancreática	1 (1,4%)			1 (4%)	0,393
IC 95%	0-7,6			0,1-20,4	
C. abdominal	9 (12,7%)	7 (22,6%)	1 (6,7%)	1 (4%)	0,085
IC 95%	6-22,7	9,6-41,1	0,2-32	0,1-20,4	
Conectivopatía	2 (2,8%)			2 (8%)	0,151
IC 95%	0,3-9,8			1-26	

Datos expresados en valor absoluto y porcentaje. VHC (virus hepatitis C), E. (enfermedad), DM (diabetes mellitus), I. (insuficiencia), C. (cirugía), IC (intervalo de confianza). Test de chi-cuadrado. Fue significativo $p < 0,05$.

4.1.1.3. TABAQUISMO EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Aproximadamente dos tercios de pacientes (69%) tienen antecedentes de tabaquismo, siendo la mayoría exfumadores (63,3%). Respecto al tabaquismo activo, los paramalignos tienen un mayor índice de exposición tabáquica (76 paquetes/año) (tabla 4.4).

Tabla 4.4. Características basales de la población de estudio. Tabaquismo.

	Total (n=71)	Malignos (n=31)	Paramalignos (n=15)	Benignos (n=25)	Valor de p
Total	49 (69%)	23 (74,2%)	11 (73,3%)	15 (60%)	0,480
IC 95%	56,9-79,5	55,4-88,1	44,9-92,2	38,7-78,9	
Activo	18 (36,7%)	8 (34,8%)	5 (45,5%)	5 (33,3%)	0,642
IC 95%	15,8-37,1	11,9-44,6	11,8-61,6	6,8-40,7	
paq/año	56,2 ± 22,9	52,8 ± 15,6	76,2 ± 22,3	42 ± 22,8	0,040
IC 95%	44,9-67,6	39,7-65,8	48,5-103,9	13,7-70,3	
Exfumador	31 (63,3%)	15 (65,2%)	6 (54,5%)	10 (66,6%)	0,779
IC 95%	31,9-56	30,2-67	16,3-67,7	21,1-61,3	
paq/año	40,7 ± 24,5	37,5 ± 26,1	51,7 ± 11,7	39 ± 27,5	0,487
IC 95%	31,8-49,7	23-52	39,4-63,9	19,3-58,7	

Datos expresados en valor absoluto y porcentaje o media ± DE. Paq/año (paquetes/año), IC (intervalo de confianza). Test de chi-cuadrado y ANOVA. Fue significativo $p < 0,05$.

4.1.1.4. ANTECEDENTES DE CÁNCER DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

El 49,3% de los pacientes tienen antecedentes familiares de cáncer y el 21,1% antecedentes personales de neoplasia, ambos sin diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

La histología más frecuente es el adenocarcinoma y la localización del tumor previo predomina en la mama y la próstata (tabla 4.5, 4.6 y 4.7).

Tabla 4.5. Características basales de la población de estudio. Antecedentes de cáncer.

	Total (n=71)	Malignos (n=31)	Paramalignos (n=15)	Benignos (n=25)	Valor de p
Familiares	35 (49,3%)	14 (45,2%)	10 (66,7%)	11 (44%)	0,316
IC 95%	37,2-61,4	27,3-64	38,4-88,2	24,4-65,1	
Personales	15 (21,1%)	5 (16,1%)	4 (26,7%)	6 (24%)	0,649
IC 95%	12,3-32,4	5,5-33,7	7,8-55,1	9,4-45,1	
T. de tumor (meses)	48,6 ± 49,3	49 ± 51,1	65 ± 53,7	40,1 ± 53,3	0,804
IC 95%	20,1-77,1	0-112,5	0-198,4	0-96,1	

Datos expresados en valor absoluto y porcentaje o media ± DE. T. (tiempo), IC (intervalo de confianza). Test de chi-cuadrado y ANOVA. Fue significativo $p < 0,05$.

Tabla 4.6. Características basales de la población de estudio. Antecedentes personales de cáncer. Localización del tumor.

	Total (n=15)	Malignos (n=5)	Paramalignos (n=4)	Benignos (n=6)	Valor de p
Localización					0,637
Mama	4 (26,7%)	1 (20%)	1 (25%)	2 (33,3%)	
Próstata	3 (20%)	1 (20%)	1 (25%)	1 (16,7%)	
Colon	2 (13,3%)	1 (20%)		1 (16,7%)	
Pulmón	1 (6,7%)		1 (25%)		
Páncreas	1 (6,7%)	1 (20%)			
Vesical	1 (6,7%)	1 (20%)			
Mama y renal	1 (6,7%)			1 (16,7%)	
Mama y gástrico	1 (6,7%)			1 (16,7%)	
Piel	1 (6,7%)		1 (25%)		

Datos expresados en valor absoluto y porcentaje. Test de chi-cuadrado. Fue significativo $p < 0,05$.

Tabla 4.7. Características basales de la población de estudio. Antecedentes personales de cáncer. Histología del tumor.

	Total (n=15)	Malignos (n=5)	Paramalignos (n=4)	Benignos (n=6)	Valor de p
Histología					0,361
Adenocarcinoma	12 (80%)	4 (80%)	2 (50%)	6 (100%)	
Papilar	2 (13,3%)	1 (20%)	1 (25%)		
Basocelular	1 (6,7%)		1 (25%)		

Datos expresados en valor absoluto y porcentaje. Test de chi-cuadrado. Fue significativo $p < 0,05$.

4.1.1.5. OTRAS CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

No hay diferencias estadísticamente significativas entre grupos en la exposición a amianto, contacto con tuberculosis ni entre la vacunación antigripal anual (tabla 4.8).

Tabla 4.8. Otras características basales de la población de estudio.

	Total (n=71)	Malignos (n=31)	Paramalignos (n=15)	Benignos (n=25)	Valor de p
Exp. a amianto	13 (18,3%)	5 (16,1%)	4 (26,7%)	4 (16%)	0,641
IC 95%	10,1-29,3	5,5-33,7	7,8-55,1	4,5-36,1	
Contacto con TBC	14 (19,7%)	5 (16,1%)	3 (20%)	6 (24%)	0,762
IC 95%	11,2-30,9	5,5-33,7	4,3-48,1	9,4-45,1	
Vacunado de la gripe	31 (43,7%)	14 (45,2%)	5 (33,3%)	12 (48%)	0,647
IC 95%	31,9-56	27,3-64	11,8-61,6	27,8-68,7	

Datos expresados en valor absoluto y porcentaje. Exp. (exposición), TBC (tuberculosis), IC (intervalo de confianza). Test de chi-cuadrado. Fue significativo $p < 0,05$.

4.1.2. CARACTERÍSTICAS AL DIAGNÓSTICO DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

A continuación, se describirán las características clínicas, radiológicas y analíticas del episodio agudo de cada uno de los diferentes grupos, así como las específicas del líquido pleural obtenido en la toracocentesis diagnóstica, y la citometría de flujo de la sangre periférica extraída en el mismo momento que dicho líquido pleural.

4.1.2.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Entre los síntomas de la población de estudio, la disnea es el más frecuente (70,4%), apareciendo fundamentalmente en los pacientes con derrame pleural maligno (87,1%), mostrando diferencias entre grupos ($p=0,013$). Diferente es la ortopnea, más frecuente en los benignos (24%). El dolor torácico es un síntoma que también predomina en los pacientes con derrame pleural maligno (64,5%), pero no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre grupos (figura 4.2). Dentro del síndrome constitucional que tenían los pacientes, la pérdida de peso es el único síntoma diferente estadísticamente entre grupos ($p=0,016$) (figura 4.3).

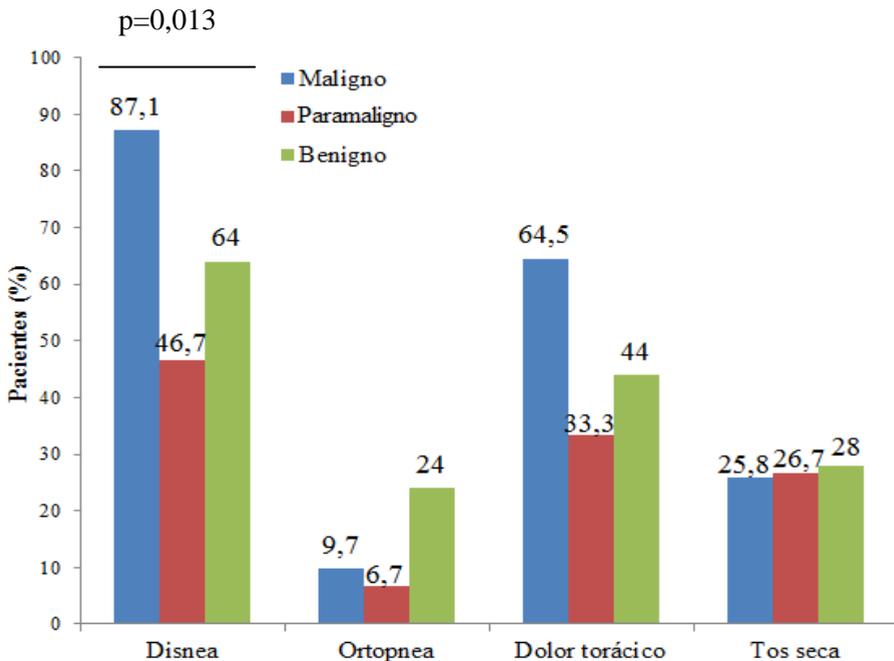


Figura 4.2. Síntomas de la población de estudio.

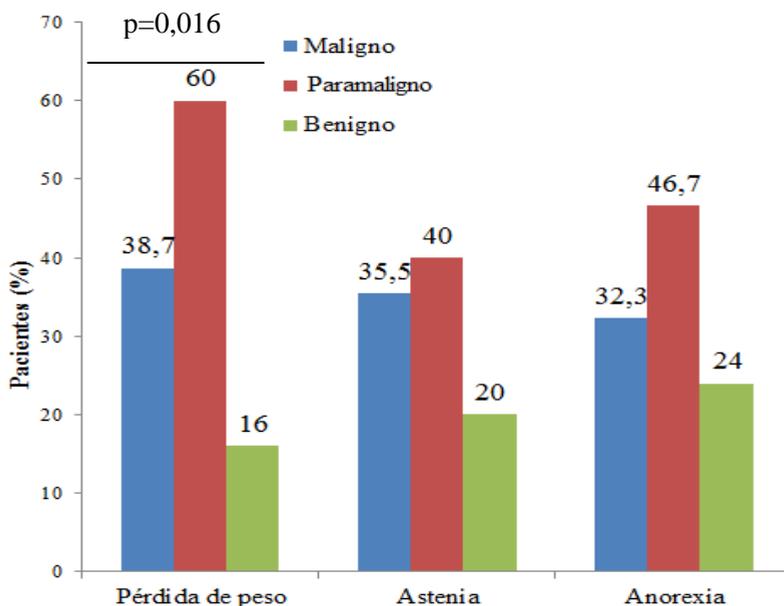


Figura 4.3. Síndrome constitucional de la población de estudio.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre grupos en las constantes (temperatura, saturación basal de oxígeno y frecuencia cardíaca) al inicio del episodio agudo.

4.1.2.2. CARACTERÍSTICAS RADIOLÓGICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Encontramos hasta en un 60% de pacientes con derrame pleural paramaligno la presencia de nódulo pulmonar ($p=0,024$) (figura 4.4) y hasta en un 86,7% una masa pulmonar visible ($p< 0,001$). Sin embargo, en los pacientes con derrame pleural maligno el engrosamiento pleural predomina sobre los otros grupos ($p=0,031$).

Las adenopatías mediastínicas son más frecuentes en los grupos paramalignos y malignos ($p=0,009$), mientras la atelectasia pulmonar lo es en los malignos y benignos ($p=0,044$) (figura 4.5).

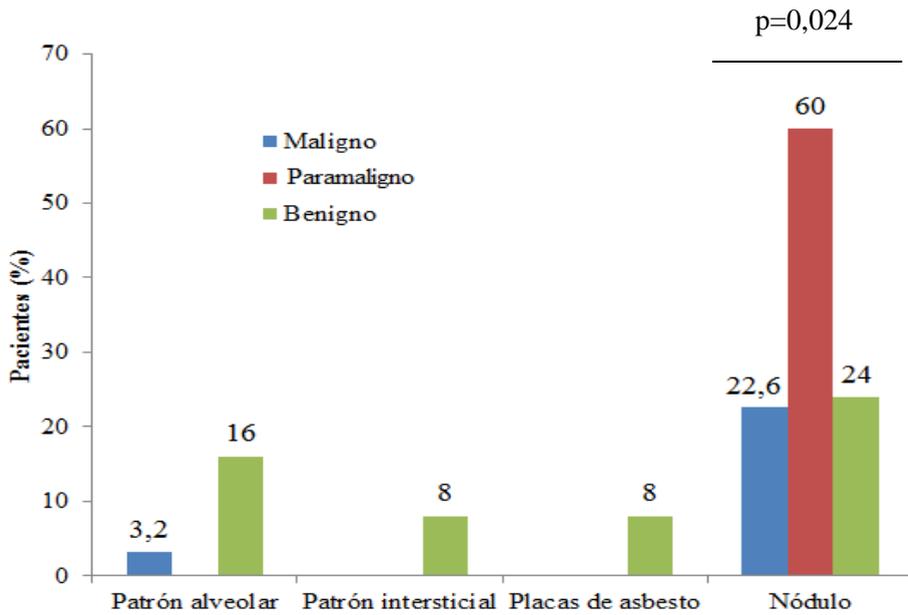


Figura 4.4. Características radiológicas de la población de estudio (1).

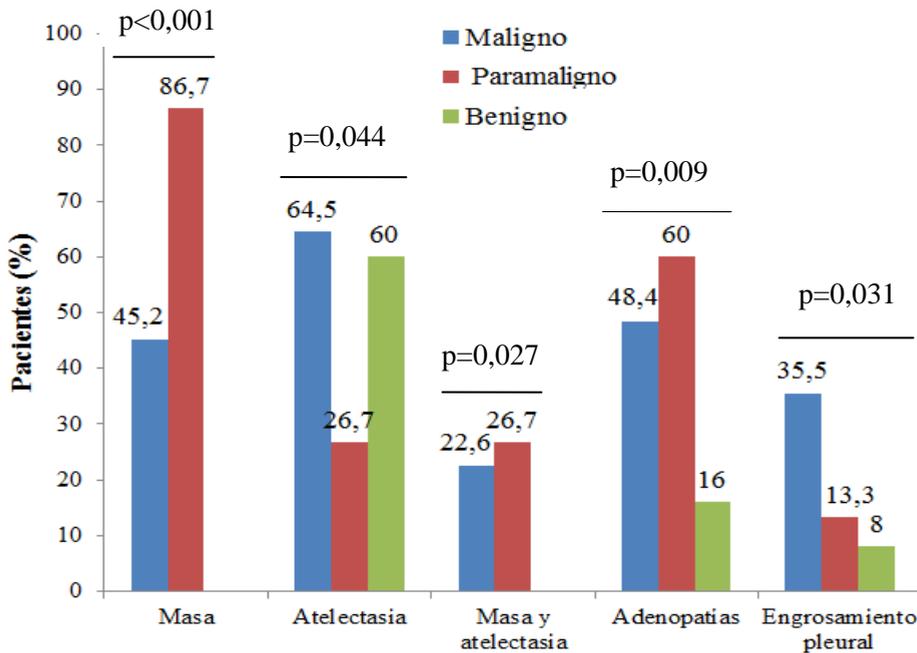


Figura 4.5. Características radiológicas de la población de estudio (2).

Más de la mitad de los derrames que ocupan dos tercios del hemitórax son malignos.

La mayoría de los derrames pleurales de la población de estudio son unilaterales, sobre todo los malignos y paramalignos ($p=0,014$) (figura 4.6).

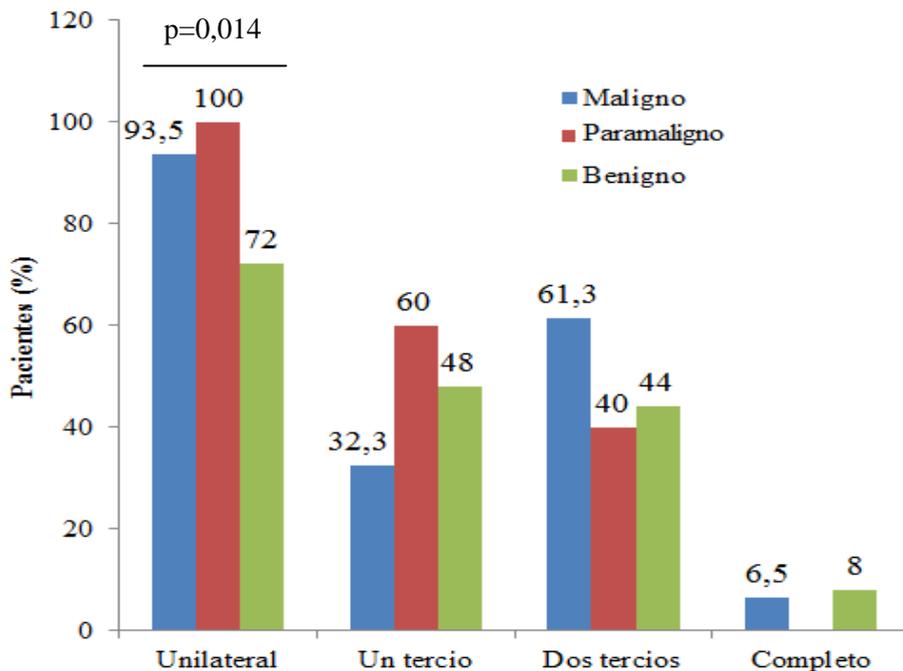


Figura 4.6. Características radiológicas del derrame pleural de la población de estudio.

4.1.2.3. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre grupos en los parámetros analíticos del hemograma, la bioquímica y la coagulación extraídos en el momento de la toracocentesis diagnóstica.

4.1.2.4. ASPECTO DEL LÍQUIDO PLEURAL EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Aunque en los derrames pleurales malignos predomina el aspecto serohemático y en los benignos y paramalignos el ambarino, no encontramos diferencias significativas en el aspecto macroscópico del líquido pleural (figura 4.7).

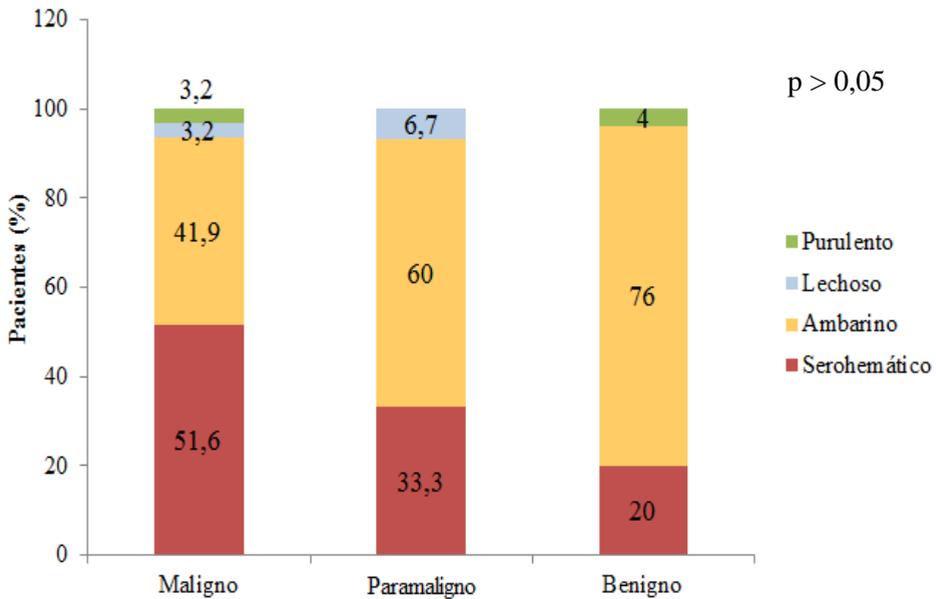


Figura 4.7. Aspecto del líquido pleural en la población de estudio.

4.1.2.5. BIOQUÍMICA Y CELULARIDAD DEL LÍQUIDO PLEURAL DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los derrames pleurales malignos de la población de estudio no se diferencian de los otros grupos por tener un pH más bajo ni una LDH más alta; sólo la determinación de glucosa es más baja ($p=0,021$) en los malignos respecto a los otros grupos.

Son exudados todos los derrames malignos, casi todos los paramalignos (93,3%) y un 80% de los benignos (p=0,027) (tabla 4.9).

Tabla 4.9. Bioquímica del líquido pleural de la población de estudio.

	Malignos (n=31)	Paramalignos (n=15)	Benignos (n=25)	Valor de p
pH	7,31 (6,42-7,48)	7,41 (7,23-7,48)	7,36 (6,35-7,50)	0,105
IC 95%	7,20-7,34	7,06-7,73	7,22-7,40	
Proteínas (g/dl)	4,2 (2,5-5,2)	4,2 (2,6-5,9)	3,7 (1,2-5,8)	0,194
IC 95%	3,8-4,3	3,7-4,6	3,2-4,1	
Albúmina (g/dl)	2,4 ± 0,6	2,2 ± 0,4	1,9 ± 0,6	0,018
IC 95%	2,1-2,6	2-2,4	1,7-2,2	
LDH (UI/L)	346 (108-6270)	274 (119-1045)	214 (90-10225)	0,628
IC 95%	300,4-1157,1	205,2-464	0-1573,6	
Exudado	31 (100%)	14 (93,3%)	20 (80%)	0,027
IC 95%		68,1-99,8	59,3-93,2	
Glucosa (mg/dl)	91 ± 41,4	128,2 ± 28,7	114,2 ± 53,8	0,021
IC 95%	75,8-106,2	112,3-144,1	91,4-136,9	
ADA (UI/L)	21,6 (5-133)	22,5 (13-140)	19 (10-188)	0,584
IC 95%	17,5-34,3	12,8-50,2	17,9-51,7	

Datos expresados en mediana (mínimo-máximo), media ± DE o valor absoluto y porcentaje. LDH (lactato deshidrogenasa), ADA (adenosina desaminasa) IC (intervalo de confianza). Prueba de Kruskal-Wallis, test de ANOVA o de chi-cuadrado. Fue significativo $p < 0,05$.

El análisis de los componentes celulares del líquido pleural en los distintos grupos no mostró diferencias (tabla 4.10).

Tabla 4.10. Celularidad del líquido pleural de la población de estudio.

	Malignos (n=31)	Paramalignos (n=15)	Benignos (n=25)	Valor de p
Leucocitos (x10e9/L)	1,8 (0,3-86,7)	0,9 (0-4,8)	1,6 (0,1-90,1)	0,629
IC 95%	0-11	0,8-2,2	0-13,2	
Linfocitos + Mononucleares %	47,9 ± 28,3	59,1 ± 23,2	53,4 ± 23	0,381
IC 95%	37,5-58,3	40,7-67,5	44,9-63,9	
Neutrófilos + Eosinófilos %	52,1 ± 28,3	40,9 ± 23,2	45,4 ± 22,7	0,352
IC 95%	41,7-62,5	27,5-54,3	36-54,8	
Hematíes (x10e12/L)	0,1 (0-0,4)	0 (0-0,4)	0 (0-0,3)	0,467
IC 95%	0-0,1	0-0,1	0-0,1	
Hematocrito %	0,4 (0-3,1)	0,2 (0-3,4)	0,3 (0-2,8)	0,436
IC 95%	0-3,1	0-3,4	0-2,8	

Datos porcentuales expresados en mediana (mínimo-máximo) o media ± DE. IC (intervalo de confianza). Prueba de Kruskal-Wallis o test de ANOVA. Fue significativo $p < 0,05$.

4.1.2.6. FENOTIPOS CELULARES EN EL LÍQUIDO PLEURAL DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se han estudiado las poblaciones linfocitarias determinando los linfocitos B (CD19+ CD3-), los linfocitos T (CD3+ CD19-), y las células NK (aquellas con características morfológicas de linfocitos que expresan el antígeno CD56 pero no el CD3 en la superficie celular) en el momento de la toracocentesis

diagnóstica. No encontramos diferencias en la expresión de una u otra estirpe celular en el líquido pleural de los distintos grupos (tabla 4.11).

Tabla 4.11. Poblaciones linfocitarias en líquido pleural.

	Malignos (n=31)	Paramalignos (n=15)	Benignos (n=25)	Valor de p
L. totales	53,5 ± 28,7	61,4 ± 15,2	56,1 ± 27,4	0,629
IC 95%	43,7-64,2	52,5-72,5	47,3-67,7	
L. B (CD3-CD19+)	6,9 (0,9-61,9)	8,6 (3,8-15,6)	5,9 (0,8-30,2)	0,219
IC 95%	3,1-15,1	4,3-16,9	2,3-13,1	
L. T (CD3+CD19-)	80,5 (0,3-92,5)	83,7 (60,6-88,6)	84,7 (0-94)	0,120
IC 95%	79,6-93,9	78,1-92,7	80,4-94,1	
NK (CD3-CD56+)	4 (0,2-51,9)	3,6 (1,4-16,4)	4,9 (0,5-19,3)	0,944
IC 95%	1,2-10,8	1,1-10,2	1,7-11,7	

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). L (linfocitos), NK (natural killer) IC (intervalo de confianza). Test de ANOVA o prueba de Kruskal-Wallis. Fue significativo $p < 0,05$.

Atendiendo a la intensidad de expresión de los antígenos de superficie CD56 y CD16 analizamos las subpoblaciones de NK. También se determinó la expresión CD57+ y el receptor de citotoxicidad natural NKp44 sin encontrar diferencias entre los grupos en ninguna de las células estudiadas. El receptor NKp44 prácticamente no se expresa en el líquido pleural (tabla 4.12).

Tabla 4.12. Poblaciones NK en líquido pleural.

	Malignos (n=31)	Paramalignos (n=15)	Benignos (n=25)	Valor de p
NK CD56 bright	8,4 (0-55)	11,1 (0,4-49,3)	8,1 (0-57,3)	0,646
IC 95%	8,6-19,8	7,8-23	8,4-24	
CD56 bright CD16-	5,2 (0-54,7)	7,2 (0,4-37,2)	3,1 (0-52,4)	0,332
IC 95%	1,9-13,2	3-14,6	0,8-10,3	
CD56 bright CD16+	1,8 (0-22,6)	2,5 (0-12,1)	0,2 (0-36,9)	0,217
IC 95%	0,3-8,2	0,7-9		
NK CD56 dim	89,8 (37,8-100)	87,5 (50,7-97,8)	91,9 (43,1-100)	0,392
IC 95%	74,8-88,6	76,3-91,6	77,3-93	
CD56 dim CD16-	30,6 (3,4-100)	44,6 (4,5-89,1)	32,7(7,8-94,8)	0,547
IC 95%	26,3-47,6	37-57,9	29,6-51,7	
CD56 dim CD16+	47,2 ± 24,9	39,5 ± 26,2	46,1 ± 26,9	0,518
IC 95%	44,1-66,1	32-52,7	44,7-67,1	
NK CD16+	55,7± 25,6	47,3 ± 28,2	55,1 ± 26,6	0,572
IC 95%	54,8-75,8	39,1-59,9	55,8-77,1	
NK CD57+	16,6 (0-50,8)	8,3 (0,9-40,8)	21,1(0,1-60,7)	0,112
IC 95%	12,1-30,1	3,7-15,9	16,6-36,5	
NKp44	0,5 (0-15,2)	0,8 (0-4,4)	0,4 (0-20,9)	0,863
IC 95%	0-6,4	0-5,7		

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). NK (natural killer) IC (intervalo de confianza). Test de ANOVA o prueba de Kruskal-Wallis. Fue significativo $p < 0,05$.

4.1.2.7. FENOTIPOS CELULARES EN LA SANGRE PERIFÉRICA DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

La sangre periférica extraída en el mismo momento que el líquido pleural, también se ha analizado por citometría de flujo para determinar las mismas células y la expresión del receptor de citotoxicidad natural NKp44.

Las poblaciones linfocitarias en la sangre periférica son iguales entre grupos, es decir, no hay mayor expresión de las células NK en sangre en ningún tipo de derrame pleural (tabla 4.13).

Tabla 4.13. Poblaciones linfocitarias en sangre periférica.

	Malignos (n=31)	Paramalignos (n=15)	Benignos (n=25)	Valor de p
L. totales	17,9 ± 12,1	17,8 ± 7,7	19,0 ± 9,8	0,909
IC 95%	11,3-27,5	11,4-27,7	12,2-28,9	
L. B (CD3-CD19+)	8 (0,8-66,7)	5,6 (1,3-20,2)	6,9 (1,3-31,8)	0,432
IC 95%	4,1-17,5	2,8-15,8	3,3-15,9	
L. T (CD3+ CD19-)	65,5 (0,1-90,2)	63,4 (28,4-80,9)	73,3 (0,8-87,9)	0,264
IC 95%	66,4-85,2	69,2-88	74,5-90,9	
NK (CD3- CD56+)	11,6 (0,7-73,2)	9,6 (1,7-16,2)	6,96 (0,7-31,3)	0,520
IC 95%	7,4-23,1	6,2-22,1	3,3-15,9	

Datos porcentuales expresados en media ± DEo mediana (mínimo-máximo). L (linfocitos), NK (natural killer) IC (intervalo de confianza). Test de ANOVA o prueba de Kruskal-Wallis. Fue significativo $p < 0,05$

En las subpoblaciones de las NK hay diferencias estadísticamente significativas entre grupos: la subpoblación CD56 dim CD16- es más alta en los benignos; las

subpoblaciones CD56 dim CD16 + y NK CD16+ aparecen mayoritariamente en malignos y paramalignos. El receptor NKp44 no se expresa en sangre periférica (tabla 4.14).

Tabla 4.14. Poblaciones NK en sangre periférica.

	Malignos (n=31)	Paramalignos (n=15)	Benignos (n=25)	Valor de p
NK CD56 bright	0,5 (0-12,7)	1,4 (0-9,1)	0,5 (0-31)	0,479
IC 95%	0,9-3,3	0,8-3,8	0,1-5,6	
CD56 bright CD16-	0,2 (0-2,7)	0,4 (0-2)	0,3 (0-17,8)	0,720
CD56 bright CD16+	0,1 (0-11,4)	0,7 (0-8,1)	0 (0-13,2)	0,155
IC 95%		0,03-5,61		
NK CD56 dim	98,6 (81,5-100)	96,9 (91,6-100)	99,4(65,9-100)	0,189
IC 95%	94,4-98	95,4-98,3	93,7-99,6	
CD56 dim CD16-	5,5 (0,3-92,1)	5,6 (0,3-24,4)	18,5(2,5-100)	0,001
IC 95%	2,3-13	2,3-13	11,8-28,1	
CD56dim CD16+	90,7 (7,4-99)	90(70,7-99)	81,4 (0-95,4)	0,001
IC 95%	87-97,7	85,7-97,1	71,9-88,2	
NK CD16+	95 (7,8-99,6)	95,6 (76,1-99,5)	86,5 (0-97,1)	0,002
IC 95%	92,8-99,8	94,4-100	78,8-92,9	
NK CD57+	48,6±20	49,2±17,4	54,4±14,5	0,454
IC 95%	40,2-60,8	40,2-60,8	43,7-64	
NKp44	0 (0-0,5)	0 (0-4,6)	0 (0-5,4)	0,968

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). NK (natural killer) IC (intervalo de confianza). Test de ANOVA o prueba de Kruskal-Wallis. Fue significativo p < 0,05.

4.1.2.8. PREDOMINIO DE LOS DISTINTOS FENOTIPOS CELULARES EN LAS MUESTRAS ESTUDIADAS

En las muestras de líquido pleural de todos los grupos la celularidad predominante es de linfocitos totales, concretamente de linfocitos T (figuras 4.8 A y B). Sin embargo, en las muestras de sangre periférica hay más células NK (figura 4.9).

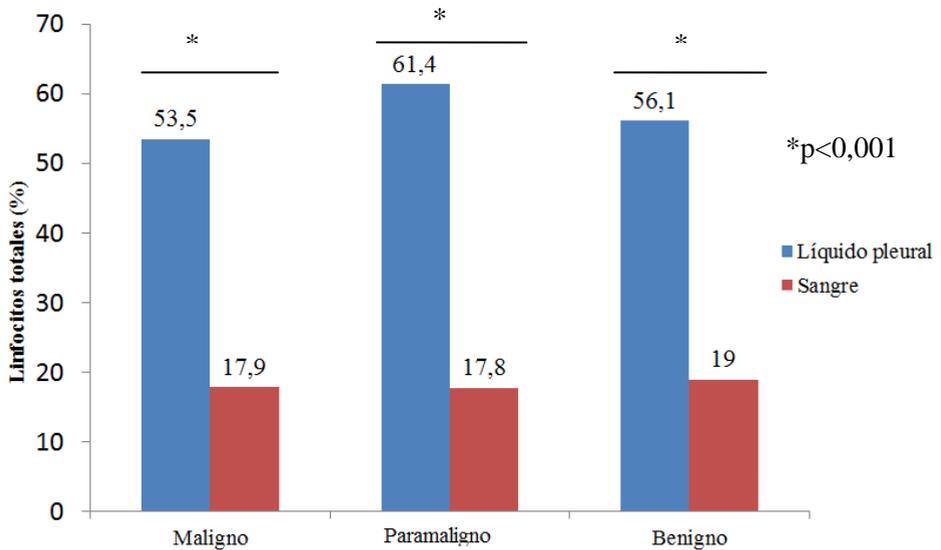


Figura 4.8 A. Linfocitos totales en líquido pleural y sangre periférica.

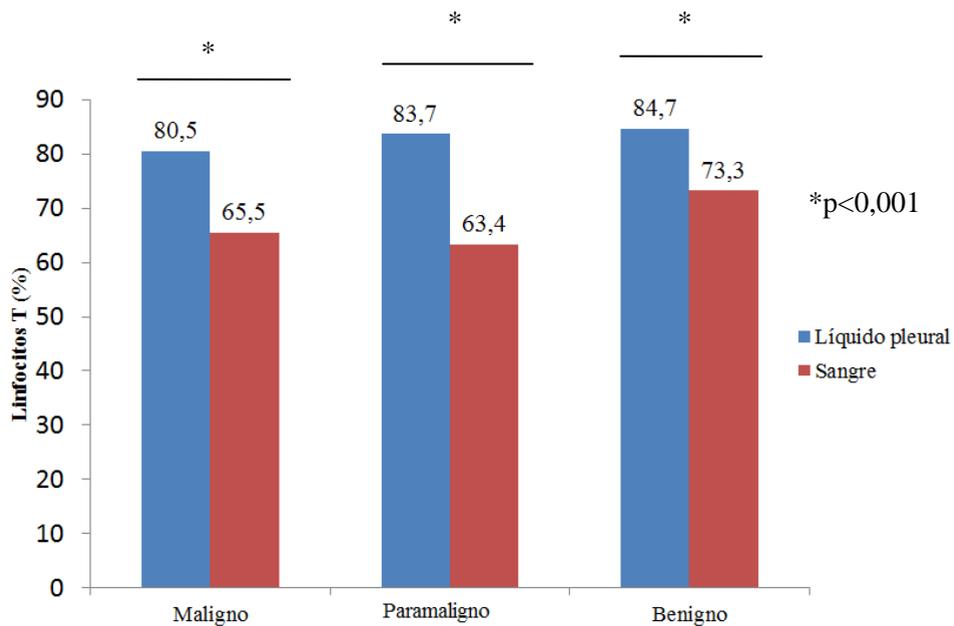


Figura 4.8 B. Linfocitos T en líquido pleural y sangre periférica.

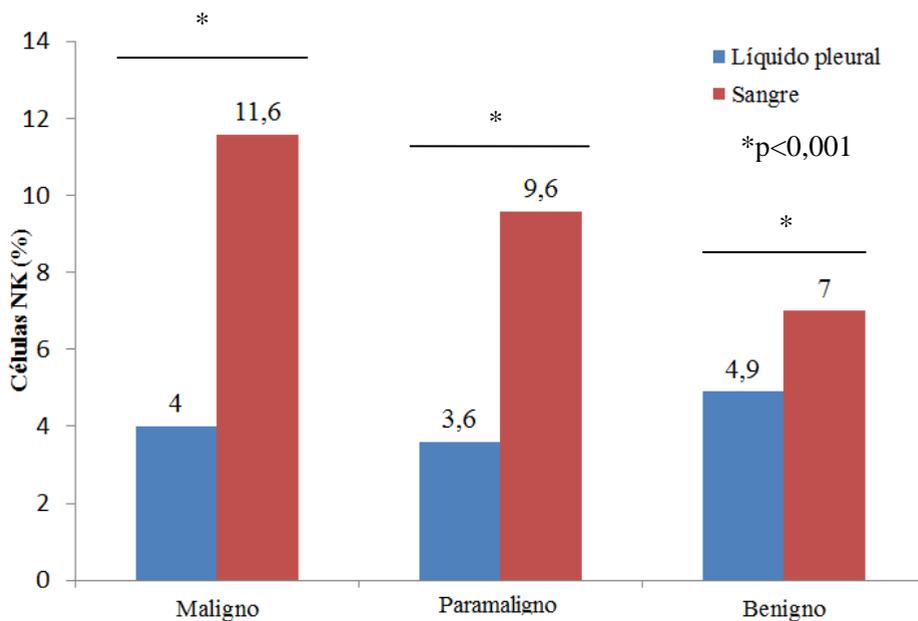


Figura 4.9. Células NK en líquido pleural y sangre periférica.

Respecto a las subpoblaciones de las NK, las CD56 bright en su conjunto así como la subpoblación CD56 dim CD16- predominan en líquido pleural en todos los grupos, mientras que el resto de subpoblaciones tienen mayor presencia en sangre periférica (figuras 4.10, 4.11, 4.12 y 4.13).

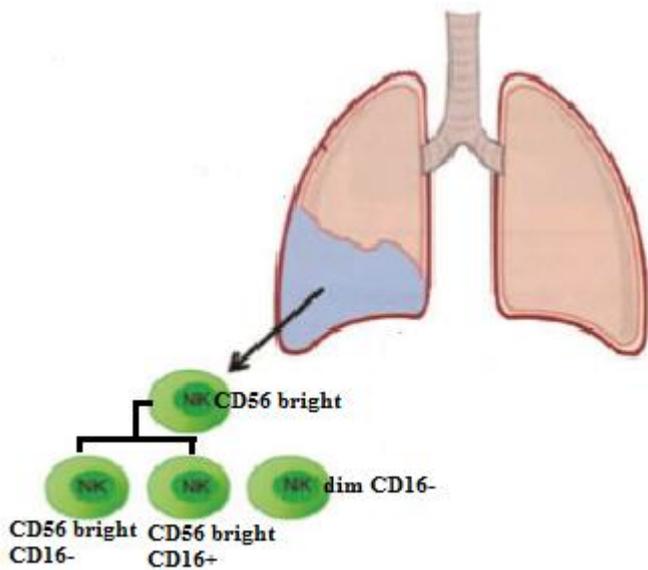


Figura 4.10. Poblaciones NK predominantes en líquido pleural en nuestro estudio.

El receptor NKp44 no se expresa ni en líquido pleural ni en la sangre periférica en ningún tipo de derrame pleural (figuras 4.11, 4.12 y 4.13).

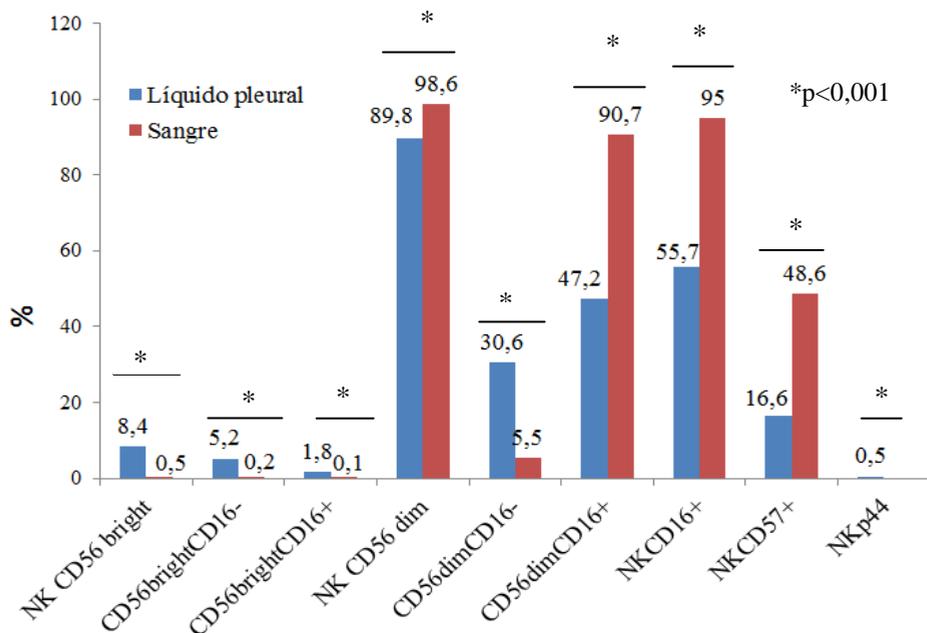


Figura 4.11. Poblaciones NK en líquido pleural y sangre periférica en los derrames malignos.

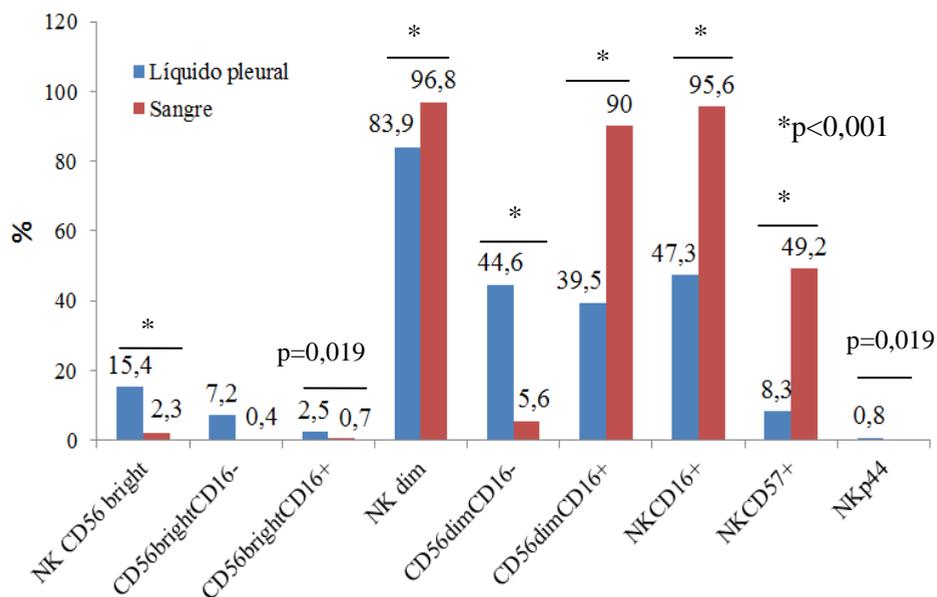


Figura 4.12. Poblaciones NK en líquido pleural y sangre periférica en los derrames paramalignos.

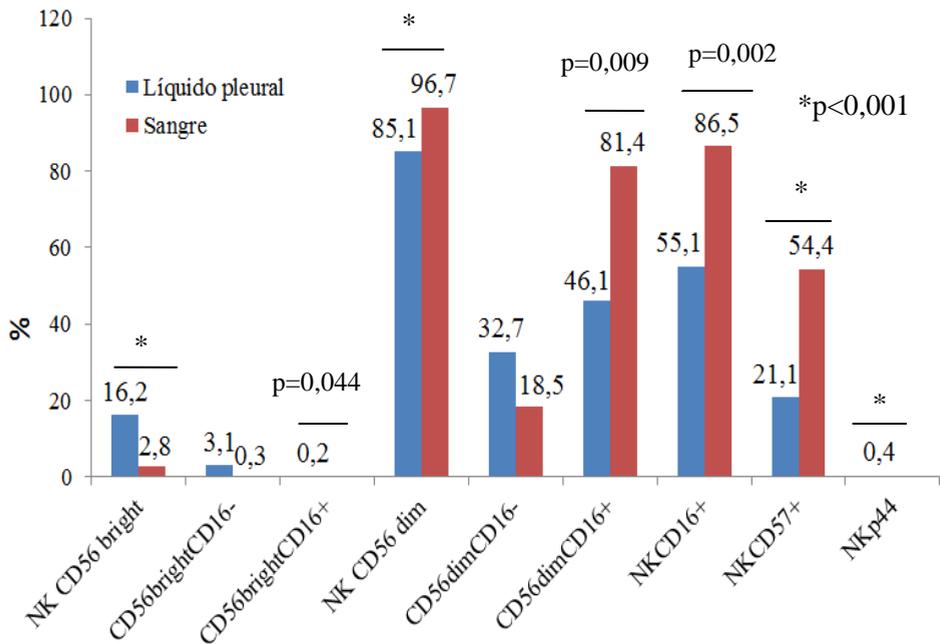


Figura 4.13. Poblaciones NK en líquido pleural y sangre periférica en los derrames benignos.

4.1.3. DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE LOS DERRAMES PLEURALES ESTUDIADOS

Se presentan los diferentes diagnósticos de los derrames pleurales de la población estudiada en la figura 4.14.

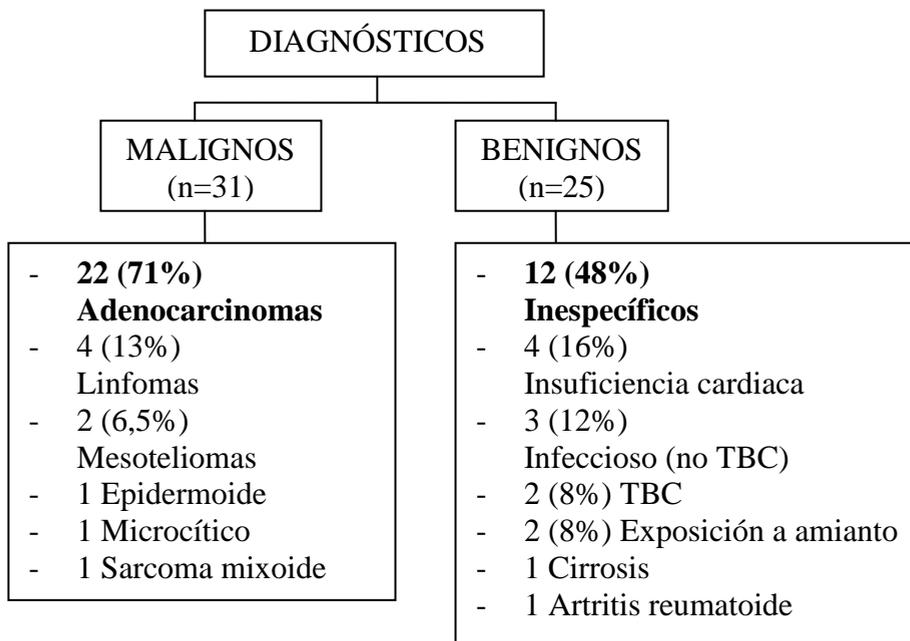


Figura 4.14. Diagnósticos de los derrames pleurales de la población de estudio.

4.1.3.1. DERRAME PLEURAL MALIGNO

De las setenta y una citologías realizadas, son positivas el 33,8% de ellas cuyo diagnóstico más frecuente es el adenocarcinoma (70,8%). Posteriormente, una segunda citología en quince pacientes (33,3% positivas) obtiene el diagnóstico de dos nuevos adenocarcinomas. Una primera biopsia pleural transparietal no guiada por ecografía es positiva en el 42,1% de los pacientes. En una segunda aproximación diagnóstica con la misma técnica, se obtienen tres nuevos diagnósticos (dos adenocarcinomas y un mesotelioma). Finalmente, en cinco pacientes hay que realizar toracoscopia para llegar al diagnóstico, que se obtiene en dos casos (rendimiento 40%): un adenocarcinoma y un sarcoma mixoide (figura 4.15).

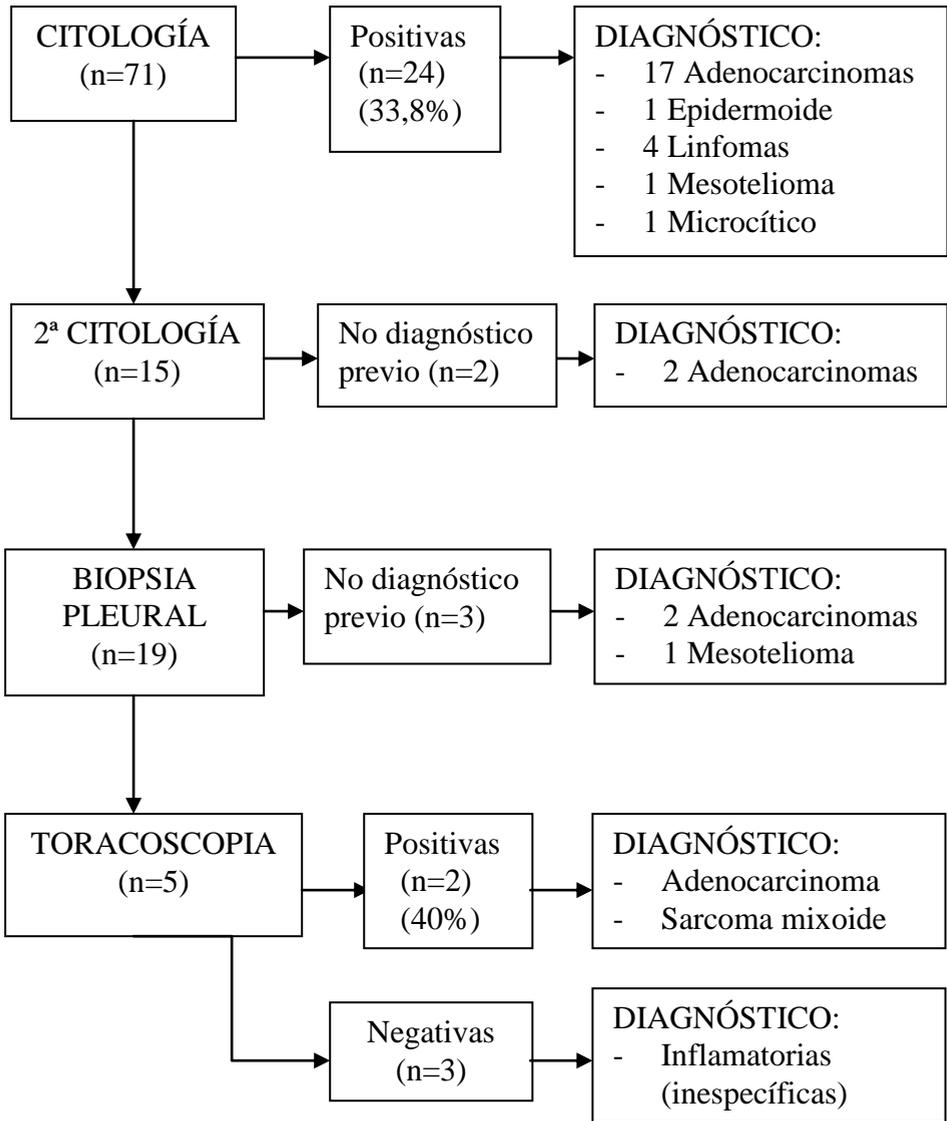


Figura 4.15. Diagnóstico del derrame pleural maligno.

En total, las técnicas pleurales empleadas tienen un rendimiento global para el diagnóstico de derrame pleural maligno en 31 casos (43,7%).

4.1.3.2. TUMORES PRIMARIOS

En cincuenta y dos pacientes se pudo determinar el tumor primario, cuya localización más frecuente es el pulmón, tanto si el derrame pleural se clasificó como maligno (51,6%) o como paramaligno (73,3%). En seis derrames pleurales se sospechó malignidad por tener tumores primarios conocidos, pero finalmente han sido clasificados como benignos y, por tanto, sin relación con el tumor primario (figura 4.16)

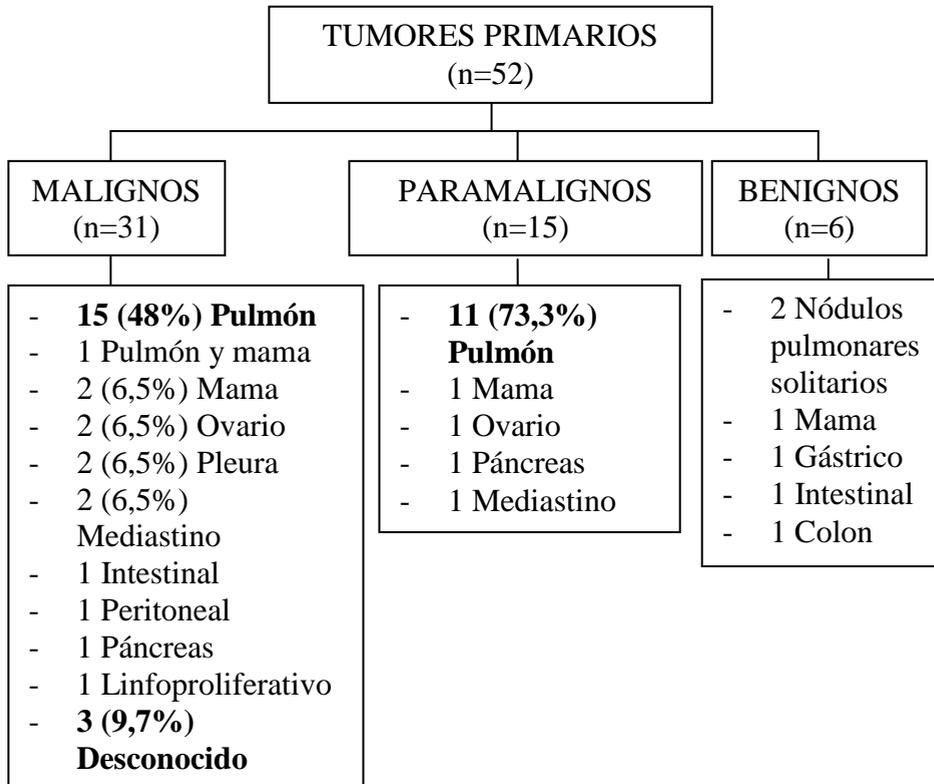


Figura 4.16. Tumores primarios de la población de estudio.

4.1.3.3. ETIOLOGÍA BENIGNA

Veinticinco derrames pleurales tienen criterios de benignidad: 48% inespecíficos, 20% infecciosos y 16% secundarios a insuficiencias cardíacas (figura 4.14).

4.1.4. ÉXITUS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

El seguimiento de toda la población es de $640,4 \pm 242$ días. Más de la mitad de los pacientes (57,7%) fallecieron durante este período de seguimiento, de ellos el 53,7% eran derrames pleurales malignos con un tiempo de supervivencia de 34 días (mediana) y el 24,4% tenían derrame pleural paramaligno con un tiempo de supervivencia de 74,5 días (mediana). La causa más frecuente de muerte fue atribuida al tumor primario (tabla 4.15).

Tabla 4.15. Éxito y tiempo de supervivencia y seguimiento de la población de estudio.

	Total (n=71)	Malignos (n=31)	Paramalignos (n=15)	Benignos (n=25)	Valor de p
Éxito	41 (57,7%)	22 (71%)	10 (66,7%)	9 (36%)	0,023
IC 95%	45,4-69,4	52-85,8	38,4-88,2	18-57,5	
Causa (cáncer)	35 (85,4%)	21 (95,5%)	10 (100%)	4 (44,4%)	0,001
IC 95%	70,8-94,4	77,2-99,9		13,7-78,8	
Tiempo (días)	57 (1-719)	34 (1-575)	74,5(17-207)	371 (17-719)	0,001
IC 95%	39,4-74,6	3,4-58,6	39,5-104,5	0-1130,7	
No éxito	30 (42,3%)	9 (29%)	5 (33,3%)	16 (64%)	0,022
IC 95%	30,6-54,6	14,2-48	11,8-61,6	42,5-82	
Tiempo (días)	640,4 ± 242	580,2 ± 258	581,2 ± 285	693,1 ± 223	0,206
IC 95%	549,9-731	381,4-779,1	227,3-935,1	573,9-812,3	

Datos expresados en valor absoluto y porcentaje, mediana (mínimo-máximo) o media ± DE. IC (intervalo de confianza). Test de chi-cuadrado, prueba de Kruskal-Wallis o test de ANOVA. Fue significativo $p < 0,05$.

4.2. CORRELACIÓN DE POBLACIONES LINFOCITARIAS Y NK DEL LÍQUIDO PLEURAL Y SANGRE PERIFÉRICA

Se ha encontrado una correlación positiva significativa en todos los fenotipos celulares, incluidas las subpoblaciones de NK, entre el derrame pleural y la sangre periférica (tabla 4.16), a excepción de NK CD56 bright, CD56 bright CD16- y NKp44. NK CD57 roza la significación estadística.

Tabla 4.16. Correlación de poblaciones linfocitarias y NK del líquido pleural y sangre periférica.

	Correlación de Pearson	Valor de p
Linfocitos totales líquido*sangre	0,332**	0,005
Linfocitos B líquido*sangre	0,432**	0,001
Linfocitos T líquido*sangre	0,368**	0,002
NK líquido*sangre	0,575**	0,001
NK CD56 bright líquido*sangre	0,201	0,092
CD56brightCD16- líquido*sangre	0,184	0,125
CD56brightCD16+ líquido*sangre	0,666**	0,001
NK CD56dim líquido*sangre	0,433**	0,001
CD56dimCD16- líquido*sangre	0,293*	0,013
CD56dimCD16+ líquido*sangre	0,247*	0,038
NKCD16 líquido*sangre	0,276*	0,020
NKCD57 líquido*sangre	0,233	0,051
NKp44 líquido*sangre	-0,024	0,841

*La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,01(bilateral)

4.3. DIFERENCIAS EN LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS ENTRE LOS DERRAMES PLEURALES MALIGNOS Y BENIGNOS

4.3.1. DIFERENCIAS EN LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS DEL LÍQUIDO PLEURAL ENTRE LOS DERRAMES PLEURALES MALIGNOS Y BENIGNOS

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en las poblaciones linfocitarias de los derrames pleurales malignos y benignos (tabla 4.17).

Tabla 4.17. Diferencias en las poblaciones linfocitarias del líquido pleural entre los derrames malignos y benignos.

	Malignos (n=31)	Benignos (n=25)	Valor de p
Linfocitos totales	53,5 ± 28,7	56,1 ± 27,4	0,748
IC 95%	43,7-64,2	47,3-67,7	
L. B (CD3- CD19+)	6,9 (0,9-61,9)	5,9 (0,8-30,2)	0,219
IC 95%	3,1-15,1	2,3-13,1	
L. T (CD3+ CD19-)	80,5 (0,3-92,5)	84,7 (0,1-94)	0,061
IC 95%	79,6-93,9	80,4-94,1	
NK (CD3- CD56+)	4 (0,2-51,9)	4,9 (0,5-19,3)	0,723
IC 95%	1,2-10,8	1,7-11,7	

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). L (linfocitos), NK (natural killer) IC (intervalo de confianza). Test T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo p < 0,05.

Tampoco las encontramos en las subpoblaciones de NK, subtipo de NK ni receptor NKp44 del líquido pleural entre los derrames malignos y benignos (tabla 4.18).

Tabla 4.18. Diferencias en las poblaciones linfocitarias del líquido pleural entre los derrames malignos y benignos. Poblaciones NK.

	Malignos (n=31)	Benignos (n=25)	Valor de p
NK CD56 bright	8,4 (0-55)	8,1 (0-57,3)	0,742
IC 95%	8,6-19,8	8,4-24	
CD56bright CD16-	5,2 (0-54,7)	3,1 (0-52,4)	0,473
IC 95%	1,9-13,2	0,8-10,3	
CD56bright CD16+	1,8 (0-22,6)	0,2 (0-36,9)	0,130
IC 95%	0,3-8,2		
NK CD56 dim	89,8 (37,8-100)	91,9 (43,1-100)	0,288
IC 95%	74,8-88,6	77,3-93	
CD56dim CD16-	30,6 (3,4-100)	32,7 (7,8-94,8)	0,520
IC 95%	26,3-47,6	29,6-51,7	
CD56dim CD16+	47,2 ± 24,9	46,1 ± 26,9	0,773
IC 95%	44,1-66,1	44,7-67,1	
NK CD16+	55,7 ± 25,6	55,1 ± 26,6	0,954
IC 95%	54,8-75,8	55,8-77,1	
NK CD57+	16,6 (0-50,8)	21,1 (1-60,7)	0,609
IC 95%	12,1-30,1	16,6-36,5	
NKp44	0,5 (0-15,2)	0,4 (0-20,9)	0,779
IC 95%	0-6,4		

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). NK (natural killer) IC (intervalo de confianza). Test T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo p < 0,05.

4.3.2. DIFERENCIAS EN LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS DE LA SANGRE PERIFÉRICA ENTRE LOS DERRAMES PLEURALES MALIGNOS Y BENIGNOS

Tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas en las poblaciones linfocitarias de la sangre periférica entre los derrames pleurales malignos y benignos (tabla 4.19).

Tabla 4.19. Diferencias en las poblaciones linfocitarias de la sangre periférica entre los derrames malignos y benignos.

	Malignos (n=31)	Benignos (n=25)	Valor de p
Linfocitos totales	17,9 ± 12,1	19 ± 9,8	0,360
IC 95%	11,3-27,5	12,2-28,9	
L. B (CD3-CD19+)	8 (0,8-66,7)	6,9 (1,3-31,8)	0,378
IC 95%	4,1-17,5	3,3-15,9	
L. T (CD3+CD19-)	65,5 (0,1-90,2)	73,3 (0,8-87,9)	0,129
IC 95%	66,4-85,2	74,5-90,9	
NK (CD3-CD56+)	11,6 (0,7-73,2)	7 (0,7-31,3)	0,299
IC 95%	7,4-23,1	3,3-15,9	

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). L (linfocitos), NK (natural killer) IC (intervalo de confianza). Test T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo $p < 0,05$.

Sin embargo, la subpoblación CD56 dim CD16- es más frecuente en los benignos, mientras que las poblaciones CD56 dim CD16 + y NK CD16+, aparece mayoritariamente en malignos, tal como se observa en la tabla 4.14 en el análisis por grupos. El NKp44 no se expresa en sangre periférica (tabla 4.20).

Tabla 4.20. Diferencias en las poblaciones linfocitarias de la sangre periférica entre los derrames malignos y benignos. Poblaciones NK.

	Malignos (n=31)	Benignos (n=25)	Valor de p
NK CD56 bright	0,5 (0-12,7)	0,5 (0-31)	0,544
IC 95%	0,9-3,3	0,1-5,6	
CD56bright CD16-	0,2 (0-2,7)	0,3 (0-17,8)	0,967
CD56bright CD16+	0,1 (0-11,4)	0 (0-13,2)	0,156
NK CD56 dim	98,6 (81,5-100)	99,4 (65,9-100)	0,182
IC 95%	94,4-98	93,7-99,6	
CD56dim CD16-	5,5 (0,3-92,1)	18,5 (2,5-100)	0,001
IC 95%	2,3-13	11,8-28,1	
CD56dim CD16+	90,7 (7,4-99)	81,4 (0-95,4)	0,001
IC 95%	87-97,7	71,9-88,2	
NK CD16+	95 (7,8-99,6)	86,5 (0-97,1)	0,002
IC 95%	92,8-99,8	78,8-92,9	
NK CD57+	48,6±20	54,4±14,5	0,245
IC 95%	40,2-60,8	43,7-64	
NKp44	0 (0-0,5)	0 (0-5,4)	0,931

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). NK (natural killer) IC (intervalo de confianza). Test de T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo p < 0,05.

4.3.3. EFICACIA DIAGNÓSTICA DEL ESTUDIO DE LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS DEL DERRAME PLEURAL DE ETIOLOGÍA DESCONOCIDA

Para determinar la eficacia diagnóstica del análisis de las poblaciones linfocitarias del líquido pleural y de la sangre periférica que mostraron diferencias para discriminar entre derrame pleural maligno y benigno, se ha realizado un análisis de curva COR con cálculo de área bajo la curva (ABC).

Las figuras 4.17 - 4.19 representan las curvas COR.

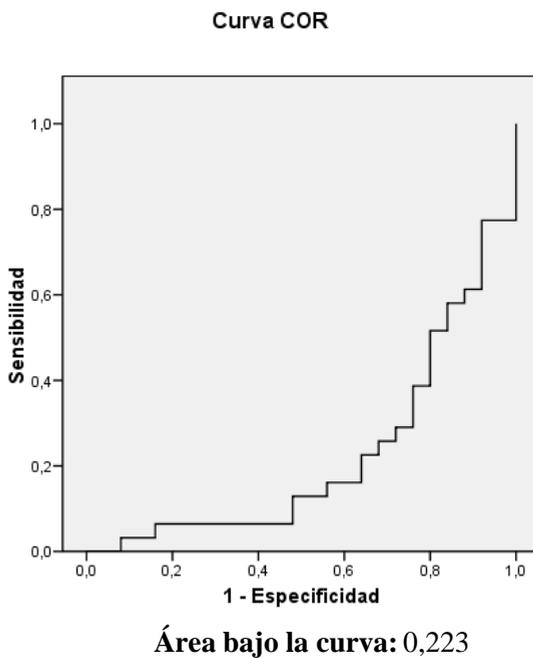


Figura 4.17. Curva COR del CD56dim CD16- en sangre periférica.

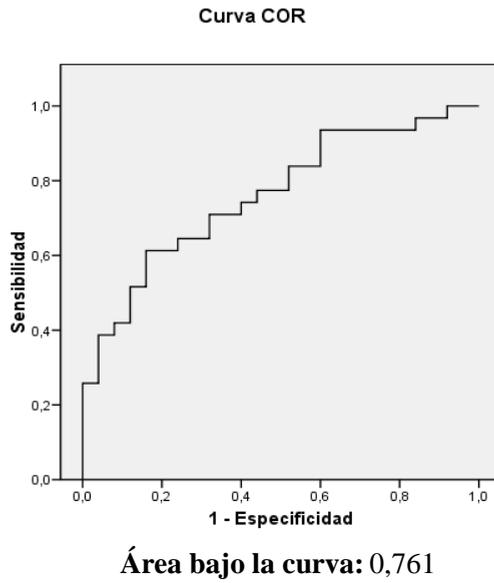


Figura 4.18. Curva COR del CD56dim CD16+ en sangre periférica

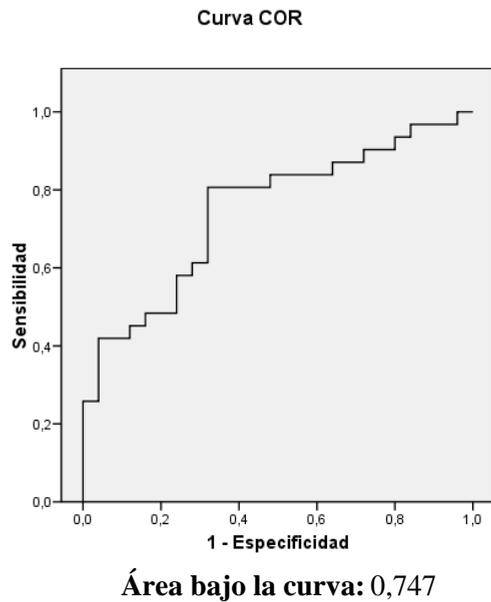


Figura 4.19. Curva COR del NK CD16+ en sangre periférica.

4.4. RATIO DE NK Y SUS SUBPOBLACIONES ENTRE LÍQUIDO PLEURAL Y SANGRE PERIFÉRICA

4.4.1. RATIO LP/SP DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE PACIENTES

Hemos analizado la ratio de las NK y sus subpoblaciones, así como del receptor NKp44 entre el líquido pleural y la sangre periférica de los distintos grupos.

Se observan diferencias estadísticamente significativas en la ratio LP/SP de la subpoblación CD56 bright CD16- y en la de la CD56 dim CD16 -, que son más altas. Es decir, existe un mayor porcentaje de células reguladoras y citotóxicas respectivamente en líquido pleural en los derrames pleurales malignos y paramalignos que en los benignos (tabla 4.21).

Tabla 4.21. Ratio LP/SP de NK y sus subpoblaciones en los diferentes grupos de pacientes.

Ratio LP/SP	Malignos (n=31)	Paramalignos (n=15)	Benignos (n=25)	Valor de p
NK	0,3(0-5,3)	0,4(0,1-1,6)	0,7(0-11,1)	0,502
IC 95%	0,3-1,1	0,4-0,9	0,4-2,4	
NK CD56 bright	9(1,7-193)	9,8(1,2-38,5)	5(0-144)	0,296
IC 95%	11,4-48,2	5,8-20,9	0-38,6	
CD56brightCD16-	17,5(2,8-359,6)	19,4(2,2-62,2)	4,9(0-49,9)	0,013
IC 95%	8-68,7	11,1-34,1	3,2-18,5	
CD56brightCD16+	3,3(0,8-49)	3,8(0,4-16,7)	5,5(0,4-123)	0,836
IC 95%	3,4-18,8	1,6-8,5	0-48,2	
NK CD56 dim	0,9(0,4-1,2)	0,9(0,5-1)	0,9(0,4-1,1)	0,540
IC 95%	0,8-0,9	0,8-0,9	0,8-0,9	
CD56dimCD16-	4,7(0,4-82,6)	6,1(1,4-64,6)	2,2(0,2-9,6)	0,003
IC 95%	4,3-16,5	4,3-26,2	1,6-3,6	
CD56dimCD16+	0,5(0-1)	0,4(0,1-0,9)	0,7(0-6,5)	0,100
IC 95%	0,4-0,6	0,3-0,6	0,4-1,7	
NKCD16+	0,6±0,3	0,5±0,3	0,7±0,4	0,165
IC 95%	0,5-0,7	0,3-0,7	0,5-0,9	
NKCD57+	0,4±0,3	0,3±0,2	0,4±0,4	0,220
IC 95%	0,3-0,5	0,1-0,4	0,3-0,6	
NKp44	2,6(0-272)	6,1(0,2-23,3)	4,3(0,3-160,5)	0,961
IC 95%	0-123,1	0-24,9	0-97	

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). NK (natural killer) IC (intervalo de confianza). Test de ANOVA o prueba de Kruskal-Wallis. Fue significativo $p < 0,05$.

4.4.2. RATIO LP/SP ENTRE LOS DERRAMES PLEURALES MALIGNOS Y PARAMALIGNOS FRENTE A BENIGNOS

Analizando conjuntamente los derrames pleurales malignos y paramalignos frente a los benignos se siguen observando las mismas diferencias estadísticamente significativas que en el análisis por grupos. Es decir, la ratio LP/SP de la subpoblación CD56 bright CD16- ($p=0,003$) y de la CD56 dim CD16- ($p<0,001$) son más altas en los malignos-paramalignos que en los derrames pleurales benignos (tabla 4.22).

Tabla 4.22. Ratio LP/SP de NK y sus subpoblaciones entre los derrames malignos-paramalignos y benignos.

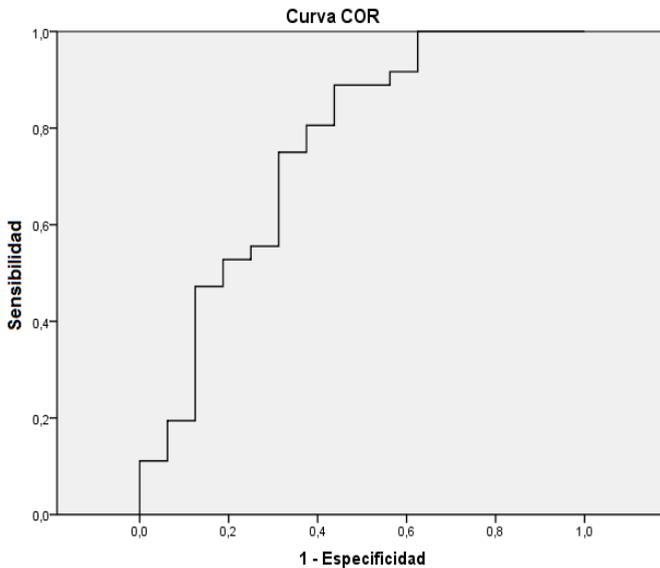
Ratio LP/SP	Malignos-paramalignos (n=46)	No malignos (n=25)	Valor de p
NK	0,4(0-5,3)	0,7(0-11,1)	0,485
IC 95%	0,4-0,9	0,4-2,4	
NK CD56 bright	10(1-230,6)	5(0-144)	0,088
IC 95%	11,8-37,3	0-38,6	
CD56brightCD16-	17,5(2,2-359,6)	4,9(0-49,9)	0,003
IC 95%	12,5-55,5	3,2-18,5	
CD56brightCD16+	3,6(0,4-49)	5,5(0,4-123)	1,000
IC 95%	3,9-13,9	0-48,2	
NK CD56 dim	0,9(0,4-1,2)	0,9(0,4-1,1)	0,284
IC 95%	0,8-0,9	0,8-0,9	
CD56dimCD16-	4,9(0,4-82,6)	2,2(0,2-9,6)	0,001
IC 95%	6,8-17,2	1,6-3,6	
CD56dimCD16+	0,5(0-1)	0,7(0-6,5)	0,067
IC 95%	0,4-0,6	0,4-1,7	
NKCD16+	0,6±0,27	0,7±0,4	0,112
IC 95%	0,5-0,6	0,5-0,9	
NKCD57+	0,4±0,3	0,4±0,4	0,311
IC 95%	0,3-0,4	0,3-0,6	
NKp44	3,9(0-272)	4,3(0,3-160,5)	0,964
IC 95%	0-81,6	0-97	

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). NK (natural killer), IC (intervalo de confianza). Test T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo $p < 0,05$.

4.4.3. EFICACIA DIAGNÓSTICA DE LA RATIO LP/SP DEL DERRAME PLEURAL CON SOSPECHA DE MALIGNIDAD

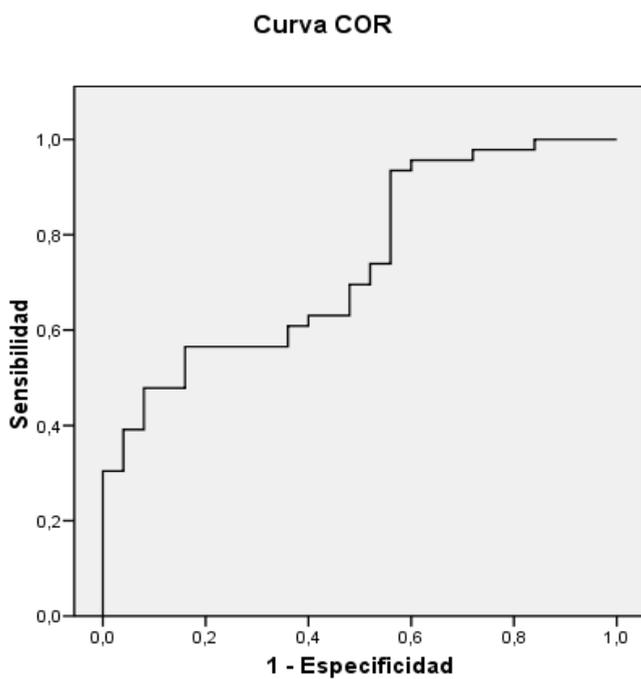
Para determinar la eficacia diagnóstica del análisis de la ratio LP/SP de las NK y sus subpoblaciones que mostraron diferencias para discriminar entre derrame pleural maligno-paramaligno y benigno, se ha realizado un análisis de curva COR con cálculo de área bajo la curva (ABC).

Las figuras 4.20 y 4.21 representan las curvas COR.



Área bajo la curva: 0,757

Figura 4.20. Curva COR de la ratio LP/SP de CD56bright CD16-



Área bajo la curva: 0,741

Figura 4.21. Curva COR de la ratio LP/SP de CD56dim CD16-.

4.5. ÁRBOL DE DECISIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO DEL DERRAME PLEURAL DE ETIOLOGÍA DESCONOCIDA

Para configurar el diagrama de árbol para el diagnóstico del derrame pleural de etiología desconocida (figura 4.22), se han utilizado como **variables dependientes los derrames pleurales malignos, paramalignos y benignos**.

Para la elección de las variables independientes se ha realizado una metodología paso a paso que ha dado como resultado las siguientes variables: antecedentes personales de cáncer, disnea, masa, engrosamiento pleural, pH y LDH en líquido pleural, pero tras el análisis de éstas, **las variables independientes incluidas en el modelo final son: antecedentes personales de cáncer, disnea, masa y engrosamiento pleural**.

En el árbol de decisión creado, observamos que **la variable dependiente (porcentaje de malignos, paramalignos y benignos)** se ramifica en dos nodos: **nodo 1 y 2** pertenecientes a la variable "MASA", indicando que ésta es la variable principal predictora.

A continuación, el **nodo 1**, en el que su Chi-cuadrado es superior a la del nodo 2, nos indica que del 62% de los que no tienen masa, el **38,6%** son malignos y el 56,8% benignos.

Posteriormente, el nodo 1 se vuelve a ramificar en los **nodos 3 y 4** pertenecientes a la variable "ENGROSAMIENTO PLEURAL". Observamos en el **nodo 4** que hay mayor porcentaje de malignos en los que tienen engrosamiento pleural, un **77,8%** frente a un 28,6% del nodo 3 que no tienen engrosamiento pleural.

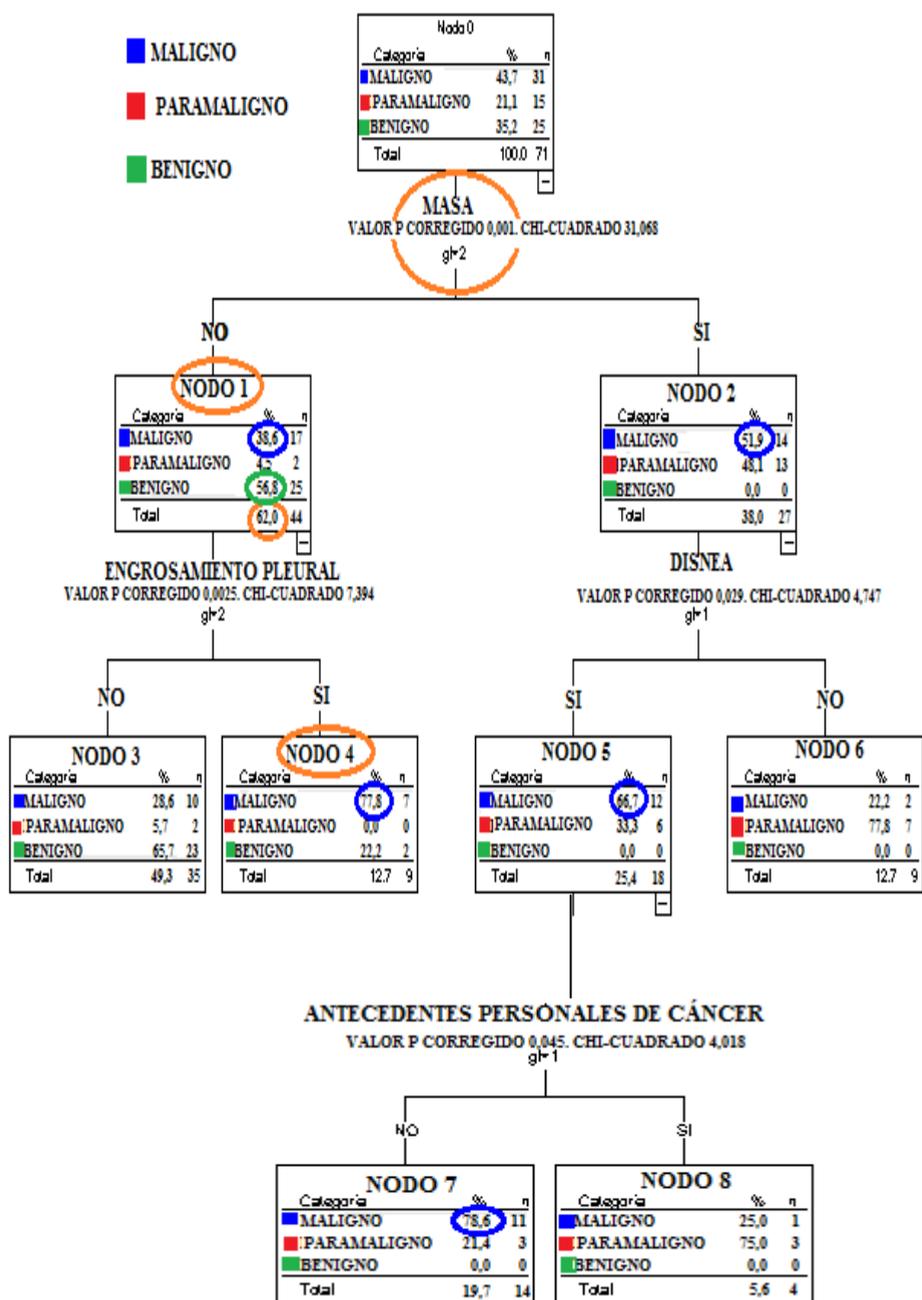


Figura 4.22. Diagrama de árbol para el diagnóstico del derrame pleural de etiología desconocida.

El modelo clasifica de forma correcta, al 71,8% de los pacientes en general. De forma específica para cada categoría de la variable dependiente clasifica al 58,1% de los malignos, al 66,7% de los paramalignos y al 92% de los benignos, con una validación cruzada de 0,059 (tabla 4.23).

Tabla 4.23. Clasificación de los derrames pleurales estudiados (CHAID).

Observado	Pronosticado			Porcentaje correcto
	Maligno	Paramaligno	Benigno	
Maligno	18	3	10	58,1%
Paramaligno	3	10	2	66,7%
Benigno	2	0	23	92%
Porcentaje global	32,4%	18,3%	49,3%	71,8%
Validación cruzada				0,059

Método de crecimiento: CHAID

Además, se han categorizado las variables cuantitativas mediante CHAID, lo que permite establecer puntos de corte de estas variables categóricas. Hemos realizado un segundo árbol de decisión (figura 4.23) para el diagnóstico del derrame pleural de etiología desconocida en el que se han incluido todas las variables del árbol de decisión anterior y las nuevas variables categóricas.

Se han utilizado como **variables dependientes los derrames pleurales malignos, paramalignos y benignos** y como variables independientes tras una metodología paso a paso: antecedentes personales de cáncer, disnea, masa, engrosamiento pleural, pH categórico (mayor o menor a 7,38) y LDH en líquido pleural categórico (mayor o menor a 169 UI/L). Finalmente, **las variables independientes incluidas en el modelo son: disnea, masa, pH categórico (mayor o menor a 7,38) y LDH en líquido pleural categórico (mayor o menor a 169 UI/L).**

En el árbol de decisión creado, observamos que **la variable dependiente (porcentaje de malignos, paramalignos y benignos)** se ramifica en dos nodos: **nodo 1 y 2** pertenecientes a la variable” **MASA**”, indicando que ésta es la variable principal predictora.

A continuación, el **nodo 2**, en el que su Chi-cuadrado es superior a la del nodo 1, nos indica que del 38% de los que tienen masa, **el 51,9% son malignos y el 48,1% paramalignos.**

Después, el nodo 2 se vuelve a ramificar en los **nodos 5 y 6** pertenecientes a la variable “**pH**”. Observamos en el **nodo 6** que hay mayor porcentaje de **malignos** en los que tienen **un pH en líquido pleural <7,38, un 83,3%** frente a un 26,7% del nodo 5 que el pH es $\geq 7,38$. Hay un **73,3% de paramalignos** cuando su **pH es $\geq 7,38$.**

Si en los pacientes que no hay masa, tienen una **LDH en líquido pleural ≤ 169 UI/L**, el **91,7%** de los derrame pleurales son **benignos.**

Según estos árboles de decisión la determinación de las poblaciones de NK en líquido pleural no incrementa la posibilidad de un diagnóstico de malignidad del derrame pleural.

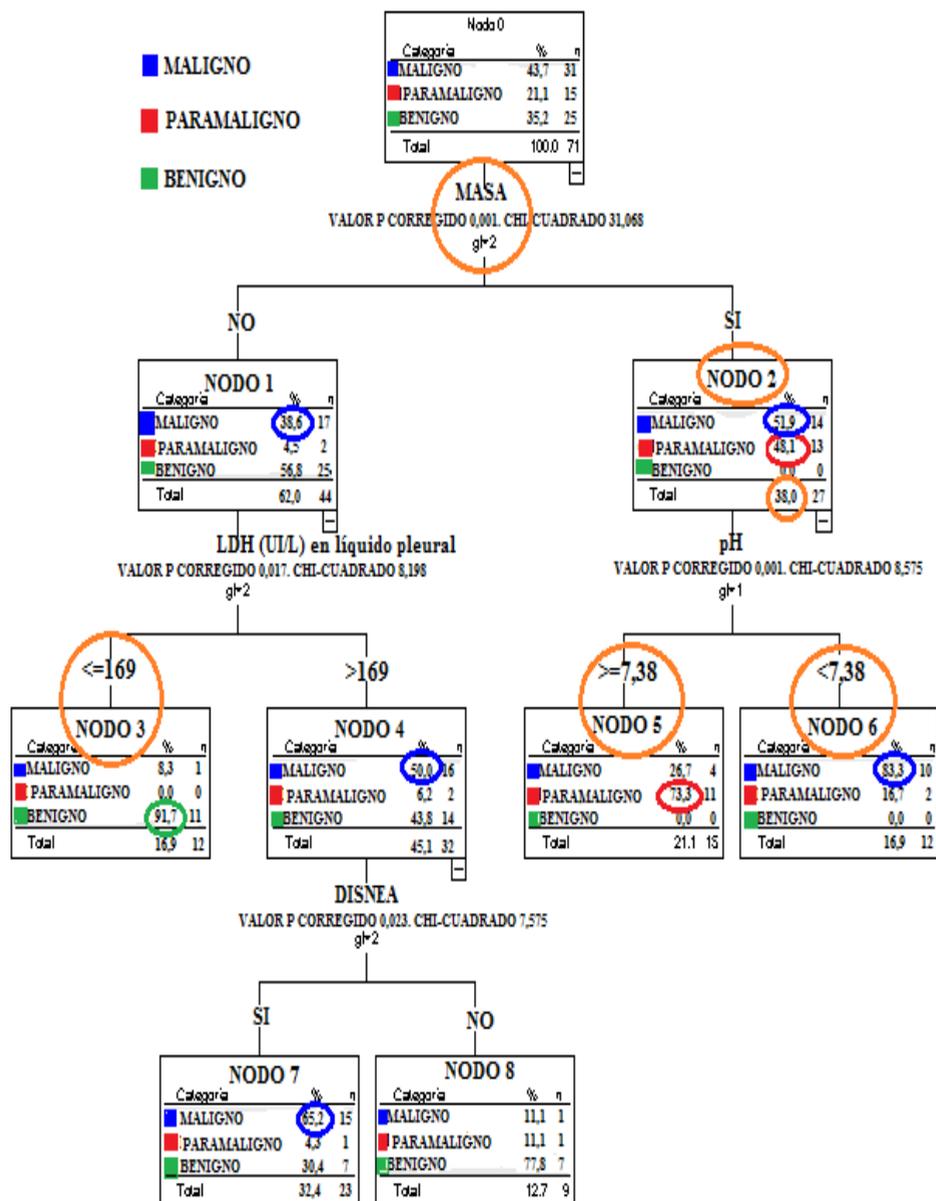


Figura 4.23. Diagrama de árbol para el diagnóstico del derrame pleural de etiología desconocida con las variables categóricas.

El modelo clasifica de forma correcta, al 76,1% de los pacientes en general. De forma específica para cada categoría de la variable dependiente clasifica al 80,6% de los malignos, al 73,3% de los paramalignos y al 72% de los benignos, con una validación cruzada de 0,057 (tabla 4.24).

Tabla 4.24. Clasificación de los derrames pleurales estudiados (CHAID con variables categóricas).

Observado	Pronosticado			Porcentaje correcto
	Maligno	Paramaligno	Benigno	
Maligno	25	4	2	80,6%
Paramaligno	3	11	1	73,3%
Benigno	7	0	18	72%
Porcentaje global	49,3%	21,1%	29,6%	76,1%
Validación cruzada				0,057

Método de crecimiento: CHAID

4.6. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA KAPLAN-MEIER

Como se observa en la figura 4.24, la probabilidad de vivir a los 90 y 100 días desde la toracocentesis diagnóstica es aproximadamente un 10% en los malignos y paramalignos respectivamente. Así mismo, los derrames pleurales malignos tienen un tiempo de supervivencia de 31 días (mediana), los paramalignos de 72 días (mediana) y los benignos de 371 días (mediana).

Existe una relación estadísticamente significativa entre que el derrame pleural sea maligno, paramaligno o benigno y el tiempo de supervivencia.

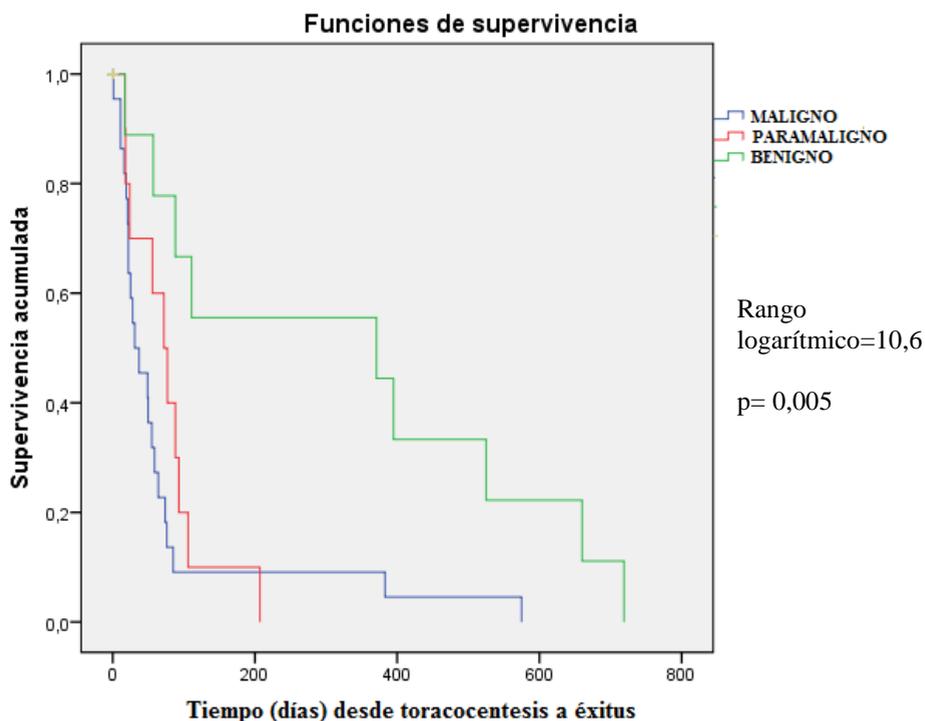


Figura 4.24. Curva de supervivencia. Kaplan-Meier.

4.7. MODELO DE REGRESIÓN DE COX CRUDO Y AJUSTADO

En primer lugar, se ha realizado el análisis crudo, es decir, para cada factor sin ajustar. Así, las poblaciones de NK que se han asociado a riesgo de muerte son: las NK CD56 bright CD16-, CD56 bright CD16+, CD56 dim CD16+ y las NK CD16+ en líquido pleural y las CD56 bright, CD56 bright CD16- y las CD56 bright CD16+ en sangre periférica.

Sin embargo, son la ratio LP/SP de las NK CD16+ y de las NK CD57+ las que alcanzan una mayor HR.

Por el contrario, los linfocitos totales, las NK CD56 dim y las CD56 dim CD16- en líquido pleural y los linfocitos T y las NK CD56 dim en sangre periférica son factores protectores.

El riesgo de tener alterados los valores porcentuales de los fenotipos celulares en los pacientes fallecidos frente a los que no fallecen están representados en las tablas 4.25 - 4.27.

Tabla 4.25. Modelo de regresión de Cox crudo de las poblaciones linfocitarias del líquido pleural en función del riesgo de los pacientes fallecidos frente a los que no fallecen.

Líquido pleural	HR (IC 95%)	Valor de p
Linfocitos totales	0,98 (0,97-1)	0,019
CD56brightCD16-	1,03 (1-1,06)	0,040
CD56brightCD16+	1,09 (1,04-1,14)	0,001
NK CD56 dim	0,98 (0,96-1)	0,015
CD56dimCD16-	0,98 (0,96-0,99)	0,001
CD56dimCD16+	1,01 (1-1,03)	0,046
NK CD16+	1,02 (1,01-1,03)	0,009

HR (hazard ratio), IC (intervalo de confianza), NK (natural killer). Fue significativo $p < 0,05$.

Tabla 4.26. Modelo de regresión de Cox crudo de las poblaciones linfocitarias de la sangre periférica en función del riesgo de los pacientes fallecidos frente a los que no fallecen.

Sangre periférica	HR (IC 95%)	Valor de p
Linfocitos T	0,98(0,96-1)	0,038
NK CD56 bright	1,17(1,08-1,27)	0,001
CD56brightCD16-	2,2(1,5-3,35)	0,001
CD56brightCD16+	1,18(1,08-1,3)	0,001
NK CD56 dim	0,88(0,82-0,94)	0,001

HR (hazard ratio), IC (intervalo de confianza), NK (natural killer). Fue significativo $p < 0,05$.

Tabla 4.27. Modelo de regresión de Cox crudo de la ratio LP/SP de NK y sus subpoblaciones en función del riesgo de los pacientes fallecidos frente a los que no fallecen.

Ratios LP/SP	HR (IC 95%)	Valor de p
NK CD16+	5,025(1,52-16,57)	0,008
NK CD57+	2,936(1,04-8,28)	0,042

HR (hazard ratio), IC (intervalo de confianza), NK (natural killer). Fue significativo $p < 0,05$.

A continuación, se calcularon las HR ajustadas por las variables que se obtuvieron tras realizar una metodología paso a paso en la que las variables son seleccionadas con exclusión secuencial. Finalmente, las variables incluidas son: antecedentes personales de cáncer, masa y ratio LP/SP de las subpoblaciones NK CD56 dim CD16- y NK CD16+. Además se añadió la presencia de derrame pleural maligno o paramaligno.

La ratio LP/SP de las NK CD16+ alcanza una HR de 6,1 (tabla 4.28).

Tabla 4.28. Modelo de regresión de Cox ajustado en función del riesgo de los pacientes fallecidos frente a los que no fallecen.

	HR (IC 95%)	Valor de p
Antecedentes personales de cáncer	2,13(0,94-4,81)	0,070
Masa	2,47(1,07-5,71)	0,035
Ratio LP/SP de CD56dimCD16-	1,03(1,01-1,05)	0,003
Ratio LP/SP de NK CD16+	6,1(1,76-21,1)	0,004
Maligno	3,35(1,22-9,17)	0,019
Paramaligno	4,74(1,21-18,55)	0,025

HR (hazard ratio), IC (intervalo de confianza), NK (natural killer). Fue significativo $p < 0,05$.

4.8. PAPEL DEL ANÁLISIS DE POBLACIONES LINFOCITARIAS EN LÍQUIDO PLEURAL Y SANGRE EN EL PRONÓSTICO DEL PACIENTE CON DERRAME PLEURAL

4.8.1. DIFERENCIAS EN LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS DEL LÍQUIDO PLEURAL EN PACIENTES ÉXITOS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Analizamos las diferencias existentes en el porcentaje de las diferentes poblaciones linfocitarias y subpoblaciones de NK en líquido pleural en los distintos grupos de pacientes (derrame pleural maligno, paramaligno y benigno) en función del fallecimiento o no de los pacientes durante el seguimiento.

4.8.1.1. DERRAME PLEURAL MALIGNO

No encontramos diferencias significativas en las poblaciones linfocitarias en líquido pleural del derrame pleural maligno aunque roza la significación estadística el porcentaje de las NK CD57+, que es mayor en los pacientes con derrame pleural maligno que fallecieron durante el seguimiento (tablas 4.29 y 4.30).

Tabla 4.29. Diferencias en las poblaciones linfocitarias del líquido pleural del derrame maligno en función del éxito.

Maligno	Éxito (n=22)	No éxito (n=9)	Valor de p
Linfocitos totales	49±28,1	64,3±28,9	0,183
IC 95%	43,1-64,4	55,7-75,3	
L. B (CD3- CD19+)	6,9 (0,9-24,9)	10,6(1,3-61,9)	0,433
IC 95%	3,1-15,1	6,1-20,4	
L. T (CD3+ CD19-)	81,4(0,3-92,5)	78,7(31,5-90,3)	0,500
IC 95%	79,6-93,9	77-92,3	
NK (CD3- CD56+)	4(0,2-20,3)	3,2(1-51,9)	0,811
IC 95%	1,2-10,8	0,7-9,2	

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). L (linfocitos), NK (natural killer) IC (intervalo de confianza). Test T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo p < 0,05.

Tabla 4.30. Diferencias en las poblaciones NK del líquido pleural del derrame maligno en función del éxito.

Maligno	Éxito (n=22)	No éxito (n=9)	Valor de p
NK CD56 bright	8,6 (0-20,7)	6,5(0,9-30,9)	0,663
IC 95%	4,2-16,4	2,2-12,6	
CD56bright CD16-	4,8(0-54,7)	5,5(0,6-28,8)	0,761
IC 95%	2,2-14,7	2,1-14	
CD56bright CD16+	1,8 (0-22,6)	2,1(0-11,7)	0,793
IC 95%	0,3-9,2	0,3-8,7	
NK CD56 dim	90,5(37,8-100)	78,2(47,1-99,1)	0,632
IC 95%	82,4-95,1	68,6-85,7	
CD56dim CD16-	23,3(3,4-100)	33,5(15,4-98,4)	0,207
IC 95%	20,2-41,9	31,5-54,1	
CD56dim CD16+	50,6±24,6	38,9±25,1	0,241
IC 95%	48,7-71,6	37,4-60,2	
NK CD16+	59,8±24,6	45,5±26,4	0,160
IC 95%	46,7-66,9	42,8-63,1	
NK CD57+	21,8(0-50,8)	10,5(0,7-33,3)	0,050
IC 95%	14,3-31,4	4,9-17,6	
NKp44	0,5(0-15,2)	1,2(0-10,9)	0,542
IC 95%	0-5,4	0-5,4	

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). NK (natural killer), IC (intervalo de confianza). Test T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo p < 0,05.

4.8.1.2. DERRAME PLEURAL PARAMALIGNO

Hay una diferencia estadísticamente significativa en la subpoblación NK CD56 bright en el líquido pleural del derrame paramaligno, siendo mayor en los éxitos que en los que no fallecen. Roza la significación estadística las subpoblaciones CD56 bright CD16-, que es más alta en los pacientes éxitos, y NK CD56 dim que es mayor en los supervivientes (tablas 4.31 y 4.32).

Tabla 4.31. Diferencias en las poblaciones linfocitarias del líquido pleural del derrame paramaligno en función del éxito.

Paramaligno	Éxito (n=10)	No éxito (n=5)	Valor de p
Linfocitos totales	58,1±17,1	67,8±8,1	0,260
IC 95%	49,9-70,3	60-79	
L. B (CD3- CD19+)	7,6(3,8-15,6)	9,2(4,2-15,1)	0,624
IC 95%	3,8-16,4	4,3-16,9	
L. T (CD3+ CD19-)	81,7 (65,2-88,6)	83,7(60,6-87,4)	0,903
IC 95%	80,9-94,7	78,2-92,7	
NK (CD3- CD56+)	3,2 (1,4-16,4)	4,1(2,1-6)	0,713
IC 95%	0,7-9,2	1,1-10,2	

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). L (linfocitos), NK (natural killer) IC (intervalo de confianza). Test T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo $p < 0,05$.

Tabla 4.32. Diferencias en las poblaciones NK del líquido pleural del derrame paramaligno en función del éxito.

Paramaligno	Éxito (n=10)	No éxito (n=5)	Valor de p
NK CD56 bright	14,9 (5-49,3)	7,4(0,4-14,6)	0,037
IC 95%	8,6-23,5	2,9-13,9	
CD56bright CD16-	10,3(4,4-37,2)	6,8(0,4-7,2)	0,050
IC 95%	5,9-20,8	2,9-13,9	
CD56bright CD16+	3,4(0-12,1)	0,6(0-7,4)	0,140
IC 95%	0,7-10,1	0-5,4	
NK CD56 dim	84,8(50,7-94,7)	92,1(85,2-97,8)	0,050
IC 95%	76,5-91,4	84,8-96,5	
CD56dim CD16-	34,6(8,4-89,1)	79,2(4,5-83,9)	0,713
IC 95%	31-52,9	69,7-86,5	
CD56dim CD16+	39,2±21,7	40,1±36,6	0,951
IC 95%	31-52,9	11-26,9	
NK CD16+	48,6±23,6	44,8±38,9	0,819
IC 95%	40,8-61,1	13,5-30,3	
NK CD57+	6,6(0,9-40,8)	10(5,1-29,5)	0,270
IC 95%	2,9-13,9	4,9-17,6	
NKp44	0,9(0-4,4)	0,7(0,1-1,7)	0,713
IC 95%	0-5,4	0-5,4	

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). NK (natural killer), IC (intervalo de confianza). Test T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo p < 0,05.

4.8.1.3. DERRAME PLEURAL BENIGNO

Aunque tampoco hay diferencias estadísticamente significativas en las poblaciones linfocitarias en el grupo del derrame pleural benigno, si la hay en la población NK CD16+ siendo mayor el porcentaje de estas células en el derrame pleural benigno de los éxitus (tablas 4.33 y 4.34)

Tabla 4.33. Diferencias en las poblaciones linfocitarias del líquido pleural del derrame benigno en función del éxitus.

Benigno	Éxitus (n=9)	No éxitus (n=16)	Valor de p
Linfocitos totales	46,4±22,4	61,5±29	0,194
IC 95%	38,5-59,5	52,5-72,5	
L. B (CD3- CD19+)	6,1(0,8-30,2)	5,3(1,7-19,4)	0,821
IC 95%	2,4-13,5	1,7-11,6	
L. T (CD3+ CD19-)	80,2(0-90,9)	88,4(68,6-94)	0,070
IC 95%	77,3-92,3	83,1-95,7	
NK (CD3- CD56+)	6,4(0,8-13,2)	3,6(0,5-19,3)	0,282
IC 95%	2,4-13,5	1,1-10,2	

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). L (linfocitos), NK (natural killer) IC (intervalo de confianza). Test T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo p < 0,05.

Tabla 4.34. Diferencias en las poblaciones NK del líquido pleural del derrame benigno en función del éxito.

Benigno	Éxito (n=9)	No éxito (n=16)	Valor de p
NK CD56 bright	17,8(0-48,9)	5,6(0-57,3)	0,552
IC 95%	11-26,9	2,2-12,6	
CD56bright CD16-	1,1(0-20,8)	3,9(0-52,4)	0,552
IC 95%	0-6,8	1,4-12,8	
CD56bright CD16+	0,1(0-36,9)	0,3(0-15,3)	0,954
NK CD56 dim	90,2(50,6-100)	94,1(43,1-100)	0,955
IC 95%	82,4-95,1	87,4-97,8	
CD56dim CD16-	18,7(9,2-67,7)	42,4(7,8-94,8)	0,113
IC 95%	14,9-34,6	42,8-65,9	
CD56dim CD16+	58,4±23,4	39,1±26,8	0,084
IC 95%	64,1-84	29,2-52,1	
NK CD16+	69,5±22,2	46,9±25,9	0,039
IC 95%	59-77,9	30,3-50,3	
NK CD57+	28,1(2,1-60,7)	16,4(1-47,1)	0,329
IC 95%	19,5-37,9	9,4-24,7	
NKp44	0,7(0-20,9)	0,4(0-13,6)	0,713
IC 95%	0-5,4		

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). NK (natural killer), IC (intervalo de confianza). Test T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo p < 0,05.

4.8.2. DIFERENCIAS EN LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS DE LA SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES ÉXITOS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Analizamos las diferencias existentes en el porcentaje de las diferentes poblaciones linfocitarias y subpoblaciones de NK en sangre periférica en los distintos grupos de pacientes (derrame pleural maligno, paramaligno y benigno) en función del fallecimiento o no de los pacientes durante el seguimiento.

4.8.2.1. DERRAME PLEURAL MALIGNO

No encontramos diferencias significativas en las poblaciones linfocitarias en sangre periférica del derrame pleural maligno pero sí en el porcentaje de las NK CD57+ que es mayor en los pacientes con derrame pleural maligno que fallecieron durante el seguimiento (tablas 4.35 y 4.36).

Tabla 4.35. Diferencias en las poblaciones linfocitarias de la sangre periférica del derrame maligno en función del éxito.

Maligno	Éxito (n=22)	No éxito (n=9)	Valor de p
Linfocitos totales	16±10,8	22,6±14,5	0,174
IC 95%	9,8-25,7	15,7-33,4	
L. B (CD3- CD19+)	7,6(4-21,2)	9(0,8-66,7)	0,965
IC 95%	4,2-17,9	5-19,2	
L. T (CD3+ CD19-)	64,6(0,1-90,2)	68,2(26,4-79,1)	0,572
IC 95%	67-85,8	69,9-87,9	
NK (CD3- CD56+)	12(0,7-39,4)	8,4(2,7-73,2)	0,965
IC 95%	7,6-23,6	4,2-17,7	

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). L (linfocitos), NK (natural killer) IC (intervalo de confianza). Test T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo p < 0,05.

Tabla 4.36. Diferencias en las poblaciones NK de la sangre periférica del derrame maligno en función del éxito.

Maligno	Éxito (n=22)	No éxito (n=9)	Valor de p
NK CD56 bright	0,5(0-12,7)	0,2(0-4,8)	0,527
IC 95%	0-5,4		
CD56bright CD16-	0,3(0-2,7)	0,1(0-0,7)	0,326
CD56bright CD16+	0,2(0-11,4)	0,1(0-4,2)	0,446
NK CD56 dim	97,4(81,5-100)	99,1(94,5-99,9)	0,177
IC 95%	91,5-99,4	94,6-100	
CD56dim CD16-	5(0,3-60,6)	6,6(0,7-92,1)	0,514
IC 95%	1,7-11,7	2,9-14,2	
CD56dim CD16+	90,5(38,1-98,7)	90,8(7,4-99)	0,896
IC 95%	86,9-97,7	85,8-97,1	
NK CD16+	95,3(60,9-99,6)	95(7,8-99,6)	0,896
IC 95%	88,7-98,4	88,7-98,4	
NK CD57+	53,6±18	36,6±20,3	0,030
IC 95%	44,7-65	26,6-46,2	
NKp44	0(0-0,4)	0(0-0,5)	0,157

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). NK (natural killer), IC (intervalo de confianza). Test T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo $p < 0,05$.

4.8.2.2. DERRAME PLEURAL PARAMALIGNO

Sin diferencias en poblaciones linfocitarias, sí las hay en la subpoblación CD56 bright CD16- en la sangre periférica del derrame paramaligno de los éxitus aunque con muy poca expresión (tablas 4.37 y 4.38).

Tabla 4.37. Diferencias en las poblaciones linfocitarias de la sangre periférica del derrame paramaligno en función del éxitus.

Paramaligno	Éxitus (n=10)	No éxitus (n=5)	Valor de p
Linfocitos totales	19,3±7,6	14,7±7,5	0,286
IC 95%	12,5-29,5	8,9-24,2	
L. B (CD3- CD19+)	5,6(2,6-20,2)	13(1,3-16)	0,221
IC 95%	2,7-14,9	8,6-25,3	
L. T (CD3+ CD19-)	67,6(28,4-74,7)	61,2(53,5-80,9)	0,624
IC 95%	70,9-88,7	62,7-82,6	
NK (CD3- CD56+)	10,7(1,7-16,2)	8,5(8,1-12,5)	0,540
IC 95%	6,7-22,2	5,1-19,6	

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). L (linfocitos), NK (natural killer) IC (intervalo de confianza). Test T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo $p < 0,05$.

Tabla 4.38. Diferencias en las poblaciones NK de la sangre periférica del derrame paramaligno en función del éxito.

Paramaligno	Éxito (n=10)	No éxito (n=5)	Valor de p
NK CD56 bright	2,4(0-9,1)	0,4(0-2,4)	0,085
IC 95%	0,2-7		
CD56bright CD16-	1(0-2)	0(0-0,4)	0,016
IC 95%	0-5,6		
CD56bright CD16+	1,1(0-8,1)	0,4(0-2,1)	0,387
IC 95%	0-5,6		
NK CD56 dim	96,4(91,6-100)	97,7(93,9-99,3)	0,806
IC 95%	90,1-98,9	93-99,8	
CD56dim CD16-	5,6(0,3-24,4)	8(1,7-17,3)	0,713
IC 95%	2,3-12,9	3,6-15,5	
CD56dim CD16+	90,3(70,7-99)	89,7(82-96,9)	1,000
IC 95%	84,5-96,4	84,5-96,4	
NK CD16+	95,8(76,1-99,5)	95,3(82-98,1)	0,806
IC 95%	90,1-98,9	88,7-98,4	
NK CD57+	47,7±19,1	52,2±14,8	0,656
IC 95%	41,8-62,1	47,7-67,8	
NKp44	0(0-4,6)	0(0-0,2)	0,753

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). NK (natural killer), IC (intervalo de confianza). Test T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo $p < 0,05$.

4.8.2.3. DERRAME PLEURAL BENIGNO

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en las poblaciones linfocitarias, en subpoblaciones NK ni en el receptor NKp44 de la sangre periférica en el derrame benigno en función de fallecer o no durante el seguimiento (tablas 4.39 y 4.40).

Tabla 4.39. Diferencias en las poblaciones linfocitarias de la sangre periférica del derrame benigno en función del éxito.

Benigno	Éxito (n=9)	No éxito (n=16)	Valor de p
Linfocitos totales	21,3±12,6	17,7±8,1	0,388
IC 95%	14,1-31,5	10,6-26,6	
L. B (CD3- CD19+)	7(1,3-31,8)	6,7(2,9-14,9)	0,865
IC 95%	3,4-16,2	3,2-15,4	
L. T (CD3+ CD19-)	71,8(0,8-87,9)	74(46,7-85,6)	0,651
IC 95%	75,3-91,6	72,7-89,5	
NK (CD3- CD56+)	6,5(0,8-23,9)	8,9(0,7-31,3)	0,462
IC 95%	3,4-16,2	4,7-18,1	

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). L (linfocitos), NK (natural killer) IC (intervalo de confianza). Test T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo $p < 0,05$.

Tabla 4.40. Diferencias en las poblaciones NK de la sangre periférica del derrame benigno en función del éxito.

Benigno	Éxito (n=9)	No éxito (n=16)	Valor de p
NK CD56 bright	0,5(0-31)	0,3(0-7,3)	0,451
IC 95%	0-5,4		
CD56bright CD16-	0,3(0-17,8)	0,3(0-4,5)	0,643
CD56bright CD16+	0 (0-13,1)	0(0-4,4)	0,843
NK CD56 dim	99,4(65,9-100)	99,5(91,9-100)	0,269
IC 95%	94,6-100	94,6-100	
CD56dim CD16-	26,3(2,6-95,9)	14,1(2,5-100)	0,213
IC 95%	18,7-37,5	8-22,6	
CD56dim CD16+	67,9(3,5-84,2)	85,2(0-95,4)	0,113
IC 95%	61,4-80,4	77,4-92	
NK CD16+	76,7(40,9-97,1)	89,1(0-96,6)	0,282
IC 95%	67,5-84,8	81,2-94,4	
NK CD57+	48,1±15	57,9±13,3	0,104
IC 95%	35-55,3	49,7-69,7	
NKp44	0(0-0,2)	0(0-5,4)	1,000

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). NK (natural killer), IC (intervalo de confianza). Test T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo p < 0,05.

4.8.3. DIFERENCIAS DE LA RATIO LP/SP DE NK EN FUNCIÓN DEL ÉXITUS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Analizamos las diferencias existentes de la ratio LP/SP de NK y sus subpoblaciones en los distintos grupos de pacientes (derrame pleural maligno, paramaligno y benigno) en función del fallecimiento o no de los pacientes durante el seguimiento.

4.8.3.1. DERRAME PLEURAL MALIGNO Y PARAMALIGNO

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en la ratio LP/SP de NK ni en el derrame pleural maligno ni en el paramaligno en función de ser o no éxitus en el seguimiento (tablas 4.41 y 4.42).

Tabla 4.41. Diferencias en la ratio LP/SP de NK del derrame maligno en función del éxito.

Maligno Ratio LP/SP	Éxito (n=22)	No éxito (n=9)	Valor de p
NK	0,3(0-5,3)	0,4(0,1-1,9)	0,514
IC 95%	0,2-1,2	0,2-1	
NK CD56 bright	10,3(2,4-230,6)	9,9(1,7-193)	0,707
IC 95%	8,7-62,6	0-114,8	
CD56brightCD16-	18,5(2,8-147,9)	10,4(2,9-359,6)	0,309
IC 95%	12,7-45,6	0-207,8	
CD56brightCD16+	2,9(1-46)	7,5(0,8-49)	0,853
IC 95%	0,7-17,3	0-45,7	
NK CD56 dim	0,9(0,4-1,2)	0,8(0,5-1)	0,408
IC 95%	0,8-0,9	0,7-0,9	
CD56dimCD16-	4,4(0,4-82,6)	5,1(1,1-45,4)	0,794
IC 95%	2,3-18	0,1-22,2	
CD56dimCD16+	0,6(0-1)	0,4(0,1-0,9)	0,139
IC 95%	0,5-0,7	0,2-0,6	
NKCD16+	0,7±0,2	0,5±0,3	0,145
IC 95%	0,5-0,8	0,3-0,7	
NKCD57+	0,4±0,3	0,3±0,3	0,296
IC 95%	0,3-0,6	0,1-0,5	
NKp44	2,2(0-60,6)	8,2(0,7-272)	0,564
IC 95%	0-63,3	0-284,3	

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). NK (natural killer), IC (intervalo de confianza). Test T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo p < 0,05.

Tabla 4.42. Diferencias en la ratio LP/SP de NK del derrame paramaligno en función del éxitus.

Paramaligno Ratio LP/SP	Éxitus (n=10)	No éxitus (n=5)	Valor de p
NK	0,4(0,1-1,6)	0,4(0,3-0,7)	0,903
IC 95%	0,3-0,1	0,3-0,6	
NK CD56 bright	11(1,2-38,5)	8,5(4-33,2)	0,782
IC 95%	3,9-21,6	0-54,2	
CD56brightCD16-	16,9(2,2-38,5)	40,8(19,4-62,2)	0,239
IC 95%	9,1-27,9	0-312,4	
CD56brightCD16+	4,2(0,4-11,5)	1,2(0,8-16,7)	0,838
IC 95%	1,6-7,7	0-28,8	
NK CD56 dim	0,9(0,5-1)	1(0,9-1)	0,086
IC 95%	0,7-0,9	0,9-1	
CD56dimCD16-	8,6(1,5-64,6)	4,6(1,4-49,1)	0,540
IC 95%	1,8-31	0-38,1	
CD56dimCD16+	0,4(0,1-0,8)	0,2(0,1-0,9)	0,713
IC 95%	0,3-0,6	0-0,9	
NKCD16+	0,5±0,2	0,5±0,4	0,764
IC 95%	0,3-0,7	0-0,9	
NKCD57+	0,2±0,2	0,3±0,3	0,398
IC 95%	0,1-0,4	0-0,7	
NKp44	7,4(0,2-23,3)	4,8(4,8-4,8)	0,655
IC 95%	0-39,7		

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). NK (natural killer), IC (intervalo de confianza). Test T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo $p < 0,05$.

4.8.3.2. DERRAME PLEURAL BENIGNO

Las ratio LP/SP de las subpoblaciones CD56 bright CD16- y CD56 dim CD16- en el derrame benigno son mayores en los que sobreviven, mientras las ratios LP/SP de las CD56 dim CD16+, NK CD16+ y NK CD57+ lo son en los que fallecen (tabla 4.43).

Tabla 4.43. Diferencia en la ratio LP/SP de NK del derrame benigno en función del éxito.

Benigno Ratio LP/SP	Éxito (n=9)	No éxito (n=16)	Valor de p
NK	0,9(0-11,1)	0,3(0-5,6)	0,428
IC 95%	0-4,7	0,2-1,8	
NK CD56 bright	2(0-144,4)	7,5(0-52,6)	0,340
IC 95%	0-72,8	2-29,8	
CD56brightCD16-	1,7(0-6,9)	16,4(0-49,9)	0,020
IC 95%	0,3-4,8	4,7-30	
CD56brightCD16+	2,8(0,4-12,1)	6,2(0,5-123)	0,606
IC 95%	0-20,5	0-75	
NK CD56 dim	0,9(0,7-1)	1(0,4-1,1)	0,955
IC 95%	0,8-1	0,8-1	
CD56dimCD16-	0,7(0,2-3,9)	3(0,2-9,6)	0,024
IC 95%	0,3-2,1	2-4,7	
CD56dimCD16+	0,9(0,6-6,5)	0,4(0-5,3)	0,008
IC 95%	0,1-3	0,1-1,5	
NKCD16+	0,9±0,3	0,6±0,4	0,025
IC 95%	0,7-1,2	0,4-0,8	
NKCD57+	0,7±0,5	0,3±0,3	0,042
IC 95%	0,3-1	0,2-0,5	
NKp44	82,5(4,6-160,5)	2,7(0,3-8)	0,165
IC 95%	0-1072,6	0-8,8	

Datos porcentuales expresados en media ± DE o mediana (mínimo-máximo). NK (natural killer), IC (intervalo de confianza). Test T de student o U de Mann-Whitney. Fue significativo p < 0,05.

4.9. ÁRBOL DE DECISIÓN PARA EL PRONÓSTICO DEL DERRAME PLEURAL DE ETIOLOGÍA DESCONOCIDA

En nuestra población, la supervivencia de los pacientes con derrame pleural maligno o paramaligno no supera el 10% a los tres meses (figura 4.24). Nos planteamos configurar un árbol de decisión mediante el método CHAID que aproxime al pronóstico del derrame pleural de etiología desconocida.

Para configurar este diagrama de árbol (figura 4.25), se ha utilizado como **variable dependiente el éxito**.

Para la elección de las variables independientes se ha realizado una metodología paso a paso que ha dado como resultado las siguientes variables: disnea, pérdida de peso, astenia, masa, engrosamiento pleural, pH y ratios LP/SP de las CD56dim CD16- y CD56dim CD16+, pero tras el análisis de éstas, **las variables independientes incluidas en el modelo final son: masa, astenia y ratio LP/SP de CD56dim CD16+**.

En el árbol de decisión creado, observamos que la **variable dependiente (éxito)** se ramifica en dos nodos: **nodo 1 y 2** pertenecientes a la variable "MASA", indicando que ésta es la variable principal predictora.

A continuación, el **nodo 1**, en el que su Chi-cuadrado es superior a la del nodo 2, nos indica que del **62%** de los que no tienen masa, el **45,5% son éxito**.

Posteriormente, el nodo 1 se vuelve a ramificar en los **nodos 3 y 4** pertenecientes a la variable "Ratio LP/SP CD56 dim CD16+". Observamos en el **nodo 4** que hay mayor porcentaje de **éxito en los que tienen una ratio LP/SP > 0,43**, un **63,3%** frente a un 7,1% del nodo 3 en el que la ratio LP/SP es $\leq 0,43$. El **92,9%** de los que **no fallecen tienen una ratio LP/SP es $\leq 0,43$** .

Siguiendo el **nodo 2**, de los que tienen **masa fallecen el 77,8%** que si además añaden **astenia, la probabilidad aumenta al 100% (nodo 6)**.

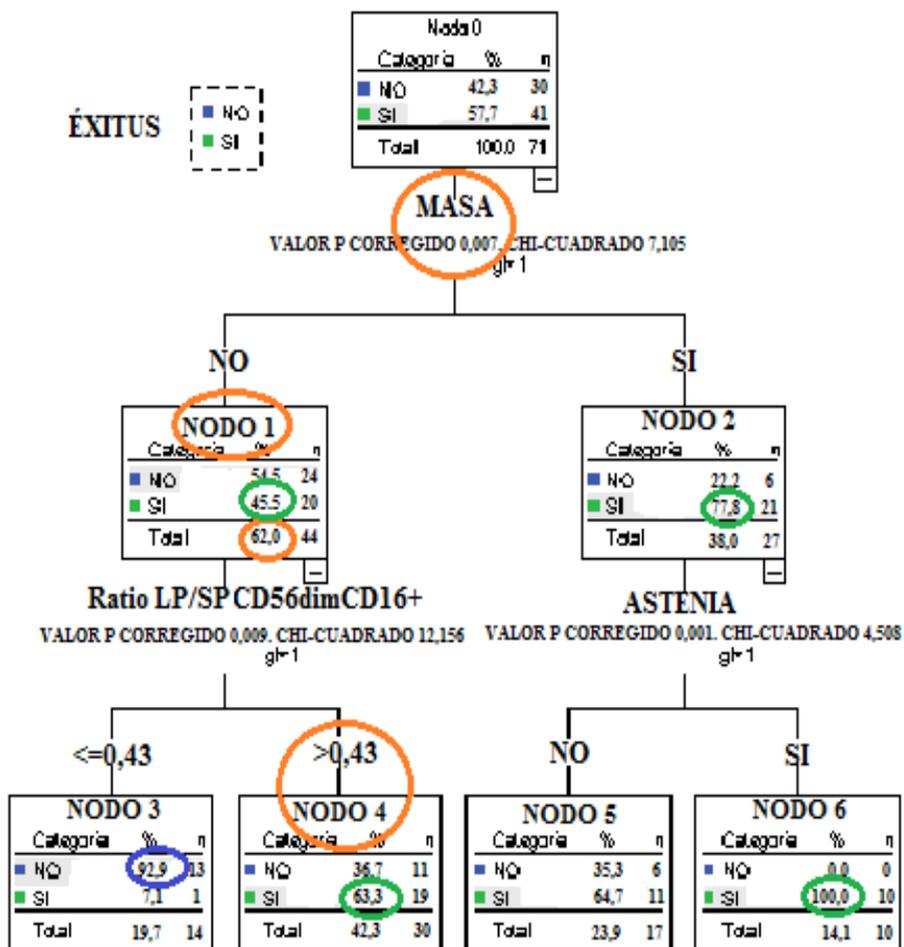


Figura 4.25. Árbol de decisión para el pronóstico del derrame pleural de etiología desconocida.

El modelo clasifica de forma correcta, al 74,6% de los pacientes en general. De forma específica para cada categoría de la variable dependiente clasifica al 97,6% de los éxitos y al 43,3% de los que no fallecen, con una validación cruzada de 0,059 (tabla 4.44).

Tabla 4.44. Clasificación en función del éxito del derrame pleural de etiología desconocida (CHAID).

Observado	Pronosticado		
	No éxito	Éxito	Porcentaje correcto
No éxito	13	17	43,3%
Éxito	1	40	97,6%
Porcentaje global	19,7%	80,3%	74,6%
Validación cruzada	0,059		

Método de crecimiento: CHAID

En resumen:

Los resultados obtenidos en el presente estudio son:

1. La disnea es el síntoma más frecuente en los pacientes con derrame pleural maligno (87,1%). Dentro del síndrome constitucional, la pérdida de peso es el único síntoma diferente estadísticamente entre grupos (mayor en paramaligno).
2. Radiológicamente encontramos la presencia de una masa pulmonar en el TAC en el 86,7% de pacientes con derrame pleural paramaligno. Sin embargo, en los pacientes con derrame pleural maligno predomina el engrosamiento pleural sobre los otros grupos.
3. Encontramos un 21,1% de derrames pleurales paramalignos entre nuestros pacientes cuya sospecha diagnóstica inicial era de malignidad.
4. Los derrames pleurales malignos no se diferencian de los otros grupos por tener un pH más bajo ni una LDH más alta; sólo la determinación de glucosa es más baja en los malignos respecto a los otros grupos.
5. En todos los grupos de derrame pleural existe un predominio en el líquido pleural en relación con la sangre periférica de las subpoblaciones NK CD56 bright o reguladoras y de la NK CD56 dim CD16- (citotóxica no dependiente de anticuerpo).
6. Hay una correlación positiva significativa en la mayoría de los valores porcentuales de los diferentes fenotipos celulares, incluidas las subpoblaciones de NK, entre el derrame pleural y la sangre periférica.
7. La determinación aislada del porcentaje de células NK y/o de sus subpoblaciones en líquido pleural de los derrames pleurales de etiología desconocida no permite diferenciar entre malignos y benignos.

8. La determinación aislada del porcentaje en sangre periférica de las subpoblaciones NK CD56 dim CD16 + y NK CD16+, con función citotóxica dependiente de anticuerpo, es un test diagnóstico con una capacidad aceptable para discriminar un paciente con derrame pleural maligno de benigno (área bajo la curva de 0,761 y 0,747 respectivamente).
9. El receptor de citotoxicidad natural NKp44, específico de la célula NK activada, no aporta valor al diagnóstico ni al pronóstico de los pacientes con derrame pleural, tampoco si es maligno.
10. La ratio LP/SP de las NK CD56 bright CD16- y NK CD56 dim CD16 -, poblaciones reguladoras y citotóxicas respectivamente, tienen una capacidad diagnóstica aceptable para discriminar un derrame pleural maligno o paramaligno del benigno (área bajo la curva 0,757 y 0,741 respectivamente).
11. La presencia de masa pulmonar en el TAC es el mejor predictor diagnóstico y pronóstico de malignidad en pacientes con derrame pleural.
12. Según nuestros árboles de decisión la determinación de las poblaciones de NK en líquido pleural no incrementa la posibilidad de un diagnóstico de malignidad del derrame pleural. Es la combinación de los hallazgos clínicos, radiológicos y de bioquímica del líquido pleural la que ayuda a establecerlo.
13. Los derrames pleurales malignos tienen una mediana de supervivencia de 31 días, los paramalignos de 72 días y los benignos de 371 días, existiendo una relación significativa entre el tipo de derrame pleural (maligno, paramaligno o benigno) y el tiempo de supervivencia.
14. En el análisis crudo, son la ratio LP/SP de NK CD16+ y NK CD57+ las que más aumentan el riesgo de muerte (HR de 5,025 y 2,936 respectivamente).

15. En el derrame pleural maligno, el porcentaje de las NK CD57+ es mayor en los pacientes que fallecieron durante el seguimiento, tanto en líquido pleural (aunque en éste roza la significación estadística) como en sangre periférica.
16. El mejor factor pronóstico de mortalidad en los pacientes con derrame pleural maligno es la ratio LP/SP de la subpoblación NK CD16+ (HR 6,1). La presencia de masa pulmonar en el TAC es la segunda variable que más influye en el pronóstico, con una HR de 2,47.
17. Son los hallazgos clínicos (astenia), radiológicos (masa pulmonar en el TAC) y una ratio LP/SP de la subpoblación NK CD56 dim CD16+ (citotóxica) $\leq 0,43$, las variables que más influyen para establecer el pronóstico del derrame pleural de etiología desconocida.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El derrame pleural maligno es un problema clínico común en los pacientes con enfermedad neoplásica. Su aparición es un signo de enfermedad avanzada ya que implica la afectación del espacio pleural por parte de dicho proceso maligno; además, asocia un deterioro sintomático y un empeoramiento en la calidad de vida que con frecuencia se acompaña de un mal pronóstico, con una supervivencia media que varía entre 3 y 12 meses desde el momento del diagnóstico⁴⁶. Dado el mal pronóstico de estos pacientes y la repercusión clínica que puede provocar esta entidad, el abordaje diagnóstico debe ser precoz.

El estudio de la citología del líquido pleural es la forma menos invasiva, rápida y eficaz para establecer este diagnóstico. Sin embargo, su sensibilidad oscila entre el 40 y el 87%, y depende principalmente del entrenamiento del citólogo, de la extensión pleural de la neoplasia y de la estirpe tumoral (mayor en adenocarcinoma)¹⁵.

La evaluación citológica de los derrames se realiza de forma rutinaria para detectar malignidad, pero un diagnóstico definitivo no siempre es posible solamente con la citología. Por lo tanto, son necesarios métodos complementarios que identifiquen células tumorales en los derrames pleurales⁵².

La citometría de flujo es una técnica que permite un análisis rápido, preciso y reproducible de las células del líquido pleural, pudiendo complementar a la citología en el estudio de los derrames pleurales sospechosos de malignidad⁵³. Actualmente se utiliza de rutina en los derrames de predominio linfocitario en los que se sospecha la existencia de linfoma¹⁵. El análisis celular por citometría de flujo tiene la ventaja de que puede estudiar tanto el tipo de celularidad como la expresión de diferentes marcadores en un gran número y tipo de células.

Con el objetivo de mejorar la precisión diagnóstica del derrame pleural maligno sería muy útil poder identificar marcadores que permitan confirmar o aumentar la posibilidad diagnóstica de la malignidad del derrame con el objetivo de iniciar intervenciones terapéuticas precoces en un intento de reducir la morbimortalidad de los pacientes.

En este sentido, puesto que las células NK están implicadas en la primera línea de defensa tumoral, teóricamente la determinación de un elevado porcentaje de células NK en el derrame pleural podría ayudar a establecer la naturaleza neoplásica del mismo. No obstante, la cuantificación de las NK en los derrames pleurales, sean malignos o benignos, ha dado resultados contradictorios en estudios previos^{74, 75, 76, 77, 78}, y sobre el valor pronóstico de las células NK en los derrames pleurales malignos aún no hay datos en la literatura, por lo que tampoco está definido su papel en relación a la supervivencia de los pacientes.

Las células NK son uno de los componentes celulares especializados más relevantes de nuestro sistema inmune innato. Se caracterizan por presentar capacidades citotóxicas e inmunorreguladoras. En este sentido, según las funciones que son capaces de realizar se han identificado subpoblaciones de células NK atendiendo a la intensidad de expresión de los antígenos de superficie CD56 y CD16 (tabla 1.2). Las NK CD56 bright son reguladoras por su alta capacidad de producción de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias⁶⁵ y las NK CD56 dim son citotóxicas por su alta actividad lítica. Además, si se acompañan de una alta expresión de CD16 las hace eficientes mediadores de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

Aunque se ha observado el fenotipo de las NK reguladoras en tumores sólidos como el carcinoma de pulmón no células pequeñas, el carcinoma de células renales y el cáncer de mama, hay una limitada información sobre los fenotipos y funciones de las células NK presentes en los derrames pleurales malignos de pacientes con tumores primarios y metastásicos de diversos orígenes. Un

reciente estudio ha comparado una subpoblación de NK, definida como CD56 bright CD16 low (alta expresión del antígeno CD56 y baja del CD16), y la CD56 dim CD16+ del líquido pleural con sangre periférica en 25 pacientes (12 mesoteliomas y 13 tumores metastásicos de diferente origen) obteniendo como resultado un predominio de la primera subpoblación descrita en la pleura y de la segunda en la sangre, por lo que parece demostrar que las células NK de los derrames pleurales son capaces de producir grandes cantidades de citoquinas en respuesta a la estimulación tumoral⁶².

Teóricamente, por la presencia de células neoplásicas en el líquido o tejido pleural, la actividad citotóxica debería estar aumentada en los derrames pleurales malignos respecto a los de otras etiologías. Se ha descrito un aumento de CD16+ en derrames pleurales por metástasis de adenocarcinoma y en mesoteliomas comparado con pacientes sanos y con exposición a amianto⁸⁴. No hay información disponible sobre la expresión CD57+ de las NK, marcador con potente potencial citotóxico, en el derrame pleural maligno. La determinación de las NK citotóxicas en el líquido pleural podría ayudar a identificar estos derrames siendo una herramienta útil para el diagnóstico de malignidad, así mismo podría contribuir al valor pronóstico, no analizado con anterioridad a nuestro trabajo, y a la respuesta al tratamiento de estos pacientes.

Las funciones de las células NK también van a ser determinadas por una compleja interacción entre los ligandos y un conjunto de receptores activadores e inhibidores. Entre los receptores responsables de la activación de las células NK destacan el CD16 y los receptores de citotoxicidad natural (NCR) NKp46, NKp44 y NKp30⁷⁹, cuya característica fundamental es que además de que se expresan selectivamente por las células NK⁸⁰, tienen importantes diferencias identificativas del estado de activación de las NK: mientras el NKp46 y el NKp30 permiten una identificación precisa de todas las células NK, independientemente de si están en reposo o activas, el NKp44 se expresa

selectivamente por la activación de las células NK⁸⁰ y, a diferencia de otros marcadores de activación, está ausente en las células T activadas. Por lo tanto, NKp44 parece ser el marcador específico de la célula NK activada. Por esta especificidad, la familia de los NCR son considerados los prototipos y los receptores más importantes de la defensa antitumoral, pero muchos de sus ligandos presentes en las células neoplásicas permanecen desconocidos, junto con su mecanismo de acción.

5.1. CARACTERÍSTICAS DEL DISEÑO DEL ESTUDIO

El presente trabajo se ha planteado incluyendo pacientes consecutivos con derrame pleural de etiología desconocida pertenecientes al Departamento de Salud Valencia-Hospital Universitario Dr. Peset con un área de influencia de 368.637 habitantes⁸¹, que van a ser sometidos a una toracocentesis diagnóstica como un procedimiento incluido en el manejo habitual de estos pacientes.

Las consideraciones al diseño del estudio son:

1. Para el análisis de poblaciones linfocitarias, subpoblaciones de NK y receptor de citotoxicidad natural NKp44 sólo se ha incluido el líquido pleural obtenido en la primera toracocentesis realizada al paciente para evitar las posibles modificaciones en la concentración de estos marcadores durante la evolución de la enfermedad. Así mismo, se analizó la sangre periférica extraída el mismo día que la primera toracocentesis diagnóstica.
2. Los resultados obtenidos en los pacientes con derrame pleural maligno se han contrastado con los benignos, definiendo como tales los derrames pleurales diagnosticados como tal o inespecíficos aunque se sospechara malignidad inicialmente, en los que se ha descartado razonablemente (por técnicas de imagen / exploraciones previas / historia y evolución clínica) una etiología tumoral.

3. En el estudio del derrame pleural con sospecha de malignidad hemos encontrado un tercer grupo de pacientes que comprende el 21,1% de nuestra población de estudio, que se diferencia tanto de los malignos como de los benignos y que tienen un mal pronóstico. Son los pacientes con derrame pleural paramaligno, definido como aquel que es atribuible a un proceso tumoral pero sin infiltración pleural directa por el tumor y en el que no se ha podido demostrar células tumorales en el líquido ni en el tejido pleural. Sin embargo, a pesar de que una considerable proporción de pacientes tiene este derrame paramaligno, esta población ha sido excluida en otros estudios^{57, 85} debido probablemente a que el comportamiento de este derrame no es tan claro como el de uno maligno o benigno. No obstante, por las características propias del mismo, hemos visto necesario la comparación entre los tres grupos diferentes de pacientes mostrando un mejor reflejo de la práctica clínica habitual.

En nuestra serie, se justifica la exclusión de los infectados por VIH por el papel que desempeñan las NK en las infecciones por virus, que puede interferir con el que ejercen frente a las células tumorales⁶⁰.

5.2. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los pacientes con derrame pleural deben estudiarse de forma sistemática. Para ello, en primer lugar se debe realizar una anamnesis dirigida en la que, además de valorar la existencia de otras enfermedades previas o actuales, se debe hacer énfasis especial en el consumo de tabaco, antecedentes familiares y personales de neoplasia y la exposición a amianto, todo ello importante para establecer una presunción clínica de derrame pleural maligno⁸⁶.

En nuestra serie, no hay diferencias en las comorbilidades, salvo en la EPOC; tampoco en los antecedentes de tabaquismo o neoplasia, ni en la exposición a

amianto, por lo que las características basales de nuestra población no mostraron influencia en el análisis de supervivencia de los pacientes.

Además, se preguntó específicamente si habían recibido la vacuna antigripal anual ya que la molécula NKp44 es específica para hemaglutininas de los virus Influenza⁷³, sin encontrar diferencias entre grupos.

Por otro lado, aunque se ha descrito que con la edad se modifica el número de células NK circulantes⁸⁷, nuestra población no muestra diferencias entre grupos, por lo que tampoco influyen en nuestros resultados los cambios de la celularidad que se producen con la edad.

5.3. SÍNTOMAS Y SIGNOS

En nuestra serie, el síntoma más frecuente en los pacientes con derrame pleural maligno es la disnea (87,1% de los casos). El dolor torácico debido a afectación de la pleura parietal, costillas o pared torácica lo padecen aproximadamente dos tercios de los pacientes con derrame pleural maligno. Tal como describe la literatura, estas manifestaciones clínicas son las propias de un gran derrame pleural⁸⁸.

La afectación pleural maligna es indicativa de enfermedad muy avanzada por lo que los pacientes con derrame pleural maligno también suelen presentar síndrome constitucional. En nuestra población, más de un tercio de los pacientes con derrame pleural maligno y paramaligno tienen pérdida de peso y astenia. Sin embargo, es la pérdida de peso el único síntoma dentro del síndrome constitucional que es diferente estadísticamente entre grupos ($p=0,016$) (figura 4.3), siendo más frecuente en los pacientes con derrame pleural paramaligno. Este hallazgo puede explicarse porque más de dos tercios de nuestros pacientes con derrame pleural paramaligno tienen cáncer de pulmón que se acompaña frecuentemente de síndrome constitucional. Nuestros datos coinciden con los de

la bibliografía⁸⁸, que recoge que la enfermedad se manifiesta por pérdida de peso y astenia aproximadamente en una tercera parte de los pacientes con derrame pleural maligno.

Radiológicamente encontramos en un 60% de pacientes con derrame pleural paramaligno la presencia de nódulo pulmonar solitario ($p=0,024$) (figura 4.4) y hasta en un 86,7% una masa ($p < 0,001$), características que hicieron sospechar malignidad. Las adenopatías mediastínicas, como patología subyacente, son más frecuentes en los grupos paramalignos y malignos ($p=0,009$), mientras la atelectasia pulmonar lo es en los malignos y benignos ($p=0,044$). También hay que sospechar neoplasia si se observa engrosamiento difuso de la pleura parietal²⁸, así en nuestros pacientes con derrame pleural maligno predominó sobre los otros grupos ($p=0,031$) (figura 4.5).

Tal y como se describe en las guías^{28, 45, 46}, más de la mitad de los derrames unilaterales que ocupan dos tercios del hemitórax son malignos. Este hecho se refleja en nuestros resultados, pues la mayoría de los derrames pleurales de la población del estudio son unilaterales, sobre todo los malignos y paramalignos ($p=0,014$) (figura 4.6).

5.4. CARACTERÍSTICAS DEL LÍQUIDO PLEURAL

El aspecto del líquido pleural proporciona una información muy útil para su orientación etiológica. La malignidad es la causa más frecuente de derrames pleurales hemáticos²⁷. En nuestra población, aunque en los derrames pleurales malignos predomina el aspecto serohemático y en los benignos y paramalignos el ambarino, no encontramos estadísticamente diferencias significativas respecto al aspecto macroscópico del líquido pleural (figura 4.7) probablemente debido a que es necesario una muestra mayor que la nuestra para poder establecer estas diferencias macroscópicas. Según un estudio realizado sobre

1040 pacientes con derrame pleural, un aspecto claramente sanguíneo sugiere enfermedad maligna, tromboembolismo pulmonar o traumatismo⁸⁹, y en la serie de García Luján²⁷ la causa más frecuente de derrames pleurales hemáticos también fue la malignidad.

La determinación del pH pleural es útil en el diagnóstico diferencial de los exudados pleurales. En nuestra serie, la determinación del pH no ha sido útil para diferenciar los tres grupos de derrames. No obstante, en los pacientes que tienen una masa pulmonar visible radiológicamente, un pH menor de 7,38 en líquido pleural clasifica al 83,3% de los derrames como malignos (figura 4.23). En las grandes series, el punto de corte del pH es menor de 7,30 en los derrames pleurales malignos y se asocia con peor pronóstico, mayor rendimiento de la citología y de la biopsia pleural y menor éxito de la pleurodesis química³⁵. Por contra, dos meta-análisis de más de 400 pacientes con derrame pleural maligno han mostrado que el pH no debería usarse como criterio único para decidir la conveniencia de la pleurodesis o para predecir la supervivencia^{36, 37}.

Los valores pleurales de LDH reflejan el grado de inflamación de las superficies pleurales. Aunque los valores de LDH del líquido pleural no muestran diferencias entre los grupos estudiados, nuestros resultados muestran que si la LDH pleural es menor o igual a 169 clasifica al 91,7% de los derrames pleurales como benignos (figura 4.23). No encontramos diferencias entre malignos y paramalignos porque en ambos procesos deben estar inflamadas las superficies pleurales. Se ha descrito que en los exudados pleurales definidos únicamente por la LDH se debe considerar el diagnóstico de neoplasia³⁹.

Se ha demostrado que los niveles bajos de glucosa son debidos al consumo excesivo por parte del metabolismo celular³⁸. Los derrames pleurales malignos de nuestra serie tienen unos niveles de glucosa en líquido pleural más bajos que el resto de grupos ($p=0,021$) (tabla 4.9). Estos datos coinciden con los publicados sobre el descenso de glucosa, que se correlaciona además con un

mayor rendimiento diagnóstico de la citología y un valor predictivo de peor pronóstico³⁸.

La diferenciación entre trasudados y exudados utilizando los criterios de Light²⁹ se considera el paso inicial en el diagnóstico etiológico de cualquier derrame pleural²⁸. En un exudado, la pleura está directamente implicada en el proceso patológico, por lo tanto los derrames pleurales malignos deben ser exudativos por definición. En nuestro estudio, además del 100% de los derrames pleurales malignos, son exudados el 93,3% de los paramalignos y el 80% de los benignos ($p=0,027$) (tabla 4.9). Llama la atención que encontramos una proporción elevada de exudados entre los derrames pleurales benignos; una explicación sería que solamente cuatro de estos derrames son debidos a insuficiencia cardiaca, causa más frecuente de trasudados⁹⁰, siendo otras las etiologías halladas en nuestros pacientes (figura 4.14).

El recuento celular es útil en el diagnóstico diferencial de los exudados pleurales. En nuestra población, ninguno de los componentes celulares del líquido pleural de los distintos grupos ha mostrado diferencias significativas (tabla 4.10). Según la literatura revisada, en los derrames que predominan los linfocitos los diagnósticos más probables son las neoplasias y la tuberculosis pleural³⁹. Nuestros datos contrastan con esta afirmación probablemente porque encontramos muchos paramalignos, derrames debidos a un proceso tumoral, en la población de estudio. Otras causas serían que en el grupo de los benignos encontramos dos pacientes diagnosticados finalmente de tuberculosis pleural cuya presunción diagnóstica inicial era de malignidad, y que prácticamente la mitad de los derrames benignos son inespecíficos. Todo ello hace que no podamos diferenciar nuestros grupos (maligno, paramaligno y benigno) por el predominio linfocitario característico del derrame pleural maligno.

5.5. DIAGNÓSTICO DE LOS DERRAMES PLEURALES

La rentabilidad obtenida de la primera citología en las setenta y una muestras analizadas es del 33,8%, y en los derrames pleurales malignos del 77,4%, cuyo diagnóstico más frecuente es el adenocarcinoma (70,9%). El análisis de muestras citológicas secuenciales incrementa la rentabilidad hasta en más del 30% en algunos estudios^{15, 25,88}. En uno de ellos, la primera citología resultó positiva en un 65%, la segunda añadió un 27% y la tercera sólo un 5%⁴¹, lo que apunta que no es rentable repetir la citología más de dos veces⁸. En nuestro trabajo la segunda citología sólo añade un rendimiento diagnóstico del 6,5%, inferior a lo descrito. Este resultado podría explicarse por la dificultad para diferenciar las células mesoteliales muy reactivas de las metástasis por adenocarcinoma⁵¹, etiología más frecuente del derrame pleural maligno en nuestro trabajo. Por lo tanto, si se han confundido ambas células habrá una mala interpretación tanto en la primera como en la segunda citología.

La realización de una biopsia pleural transparietal está recomendada cuando la citología no es diagnóstica en un derrame pleural sospechoso de malignidad⁸⁶. Su sensibilidad es inferior a la de la citología, y oscila alrededor del 50%²⁸. Tan sólo el 7-12% de los pacientes con derrame pleural maligno pueden ser diagnosticados por biopsia pleural cuando la citología es negativa⁴⁵. El uso conjunto de la citología y la biopsia pleural ciega mejora el rendimiento diagnóstico, incrementando la sensibilidad hasta el 73%, por lo que se recomienda añadir toma de muestras mediante biopsia cuando se requiera una segunda toracocentesis diagnóstica²⁸. En nuestro trabajo, aunque la mayoría de las biopsias se realizaron junto a la segunda muestra citológica, sólo el 9,7% de los pacientes con derrame pleural maligno fueron diagnosticados con la biopsia pleural transparietal a ciegas cuando la citología previa era negativa, cifra que se aproxima a lo publicado⁴⁵. La menor sensibilidad de la biopsia pleural se debe a varios factores, como el estadio precoz con mínima afectación pleural, la

distribución parcheada del tumor en la pleura afectada y la dificultad en la obtención de muestras, bien por la técnica usada, bien por la experiencia del médico que practica la biopsia. Si se observa un marcado engrosamiento pleural difuso con escasa cantidad de líquido o presencia de grandes nódulos en la pleura parietal mediante ecografía o TAC, el rendimiento puede llegar a un 85% si se realiza punción-biopsia guiada por estas técnicas de imagen²⁸.

La toracoscopia está indicada en un derrame pleural exudativo sin diagnóstico tras la realización de una toracocentesis diagnóstica y una biopsia pleural cerrada, o tras toracocentesis seriadas. Esta técnica tiene un rendimiento diagnóstico superior al 95%²⁸ con una sensibilidad en torno al 97%⁴². Además, permite tomar bajo control visual amplias biopsias de la pleura parietal y visceral (para inmunohistoquímica y otros estudios), valorar la carga tumoral en la cavidad pleural, apreciar la existencia de tabiques y cámaras residuales y realizar el diagnóstico y el tratamiento en el mismo acto, llevando a cabo una pleurodesis química dirigida. En nuestra serie, cinco pacientes fueron sometidos a toracoscopia y se han diagnosticado dos derrames pleurales malignos y tres inespecíficos. Factores como el entrenamiento del operador, un examen incompleto de la superficie pleural por adhesiones, o una muestra insuficiente o no representativa podrían haber influido en estos resultados⁸⁸.

El diagnóstico histológico más frecuente del derrame pleural maligno es el adenocarcinoma^{45, 47}. Coincidiendo con la literatura, este es el tipo histológico más frecuente en nuestro estudio (71%), seguido del linfoma (13%) y del mesotelioma (6,5%). Pocos estudios han estimado la proporción de derrame pleural debido a mesotelioma: estudios de los años 1975, 1985 y 1987 identifican mesotelioma en 1/271, 3/472 y 22/592 pacientes respectivamente⁴⁶. Pero, dependiendo de la exposición a amianto, el mesotelioma puede llegar a ser la tercera causa de derrame pleural maligno²⁸.

La mayoría de los derrames pleurales malignos son producidos por metástasis pleurales, sobre todo de tumores pulmonares (más de un tercio de los casos) y de mama; ambos representan del 50 al 65% de los mismos⁹¹. Linfomas y, con menos frecuencia tumores del tracto genitourinario y gastrointestinal entre otros, también son causa de derrame pleural maligno⁴⁶. Sin embargo, a pesar de todas las técnicas diagnósticas, en torno al 7-15% de los derrames pleurales malignos son de primarios desconocidos^{46, 91}. En nuestra serie, la localización más frecuente del tumor primario es el pulmón, tanto si el derrame pleural se clasificó como maligno (51,6%) o como paramaligno (73,3%), y el porcentaje de los primarios desconocidos corresponde al 9,7% de los derrames pleurales malignos, cifras que coinciden con las referidas en la literatura.

5.6. PAPEL DE LOS FENOTIPOS CELULARES EN EL DIAGNÓSTICO DEL DERRAME PLEURAL DE ETIOLOGÍA DESCONOCIDA

Con el objetivo de evaluar la utilidad de cuantificar las poblaciones linfocitarias, especialmente las células NK y sus subpoblaciones, en los derrames pleurales de etiología desconocida como posible marcador de malignidad, se ha analizado la correlación existente entre líquido pleural y sangre periférica de estas células, y las diferentes poblaciones entre los derrames malignos y benignos, así como entre los malignos y paramalignos frente a los benignos.

5.6.1. FENOTIPOS CELULARES EN LÍQUIDO PLEURAL

El derrame pleural maligno suele ser un exudado en el que las células NK, cuya función principal es la de identificar y destruir las células tumorales diana, pueden tener un papel en la defensa local contra la invasión neoplásica de la cavidad pleural. En nuestro trabajo, aunque centra la atención en el estudio de las células NK por ser más específicas que los linfocitos T en la defensa

tumoral, se han analizado los linfocitos B y T como componentes de las poblaciones linfocitarias tanto en el líquido pleural como en la sangre periférica. El análisis de la celularidad linfocitaria del líquido pleural no muestra diferencias en la expresión de una u otra estirpe celular entre nuestros grupos de pacientes (tabla 4.11 y 4.13), ni entre malignos y benignos (tabla 4.17). La cuantificación de las poblaciones linfocitarias (linfocitos B, linfocitos T y células NK) en los derrames pleurales ha dado resultados contradictorios en estudios previos: respecto a los linfocitos B y T, Sikora y colaboradores⁷⁷ no encontraron diferencias en el porcentaje de linfocitos B ni de linfocitos T entre derrames malignos y benignos, mientras Atanackovic y colaboradores⁹², aunque no en el porcentaje de linfocitos T, sí hallaron un porcentaje de linfocitos B más alto en los malignos.

Respecto a las células NK, existen datos contradictorios: unos autores observaron un aumento del porcentaje de células NK en derrame pleural maligno^{74, 75, 76}, otros disminución⁷⁷, e incluso algunos grupos no hallaron diferencias entre derrames benignos y malignos⁷⁸. Teóricamente, la determinación de un elevado porcentaje de células NK en los derrames malignos podría ayudar a establecer su naturaleza tumoral. Sin embargo, los datos publicados parecen indicar que no es suficiente determinar solamente las NK totales para diferenciar derrames malignos de benignos. En este sentido, puesto que las NK totales es una población amplia, hemos considerado interesante centrar la investigación en el estudio de las subpoblaciones de NK que se caracterizan por tener funciones más específicas, reguladoras o citotóxicas.

La presencia de células neoplásicas en el líquido o tejido pleural debería reflejar el aumento de la actividad citotóxica en los derrames pleurales malignos respecto a los de otras etiologías. Disponemos de escasa información sobre las diferencias de las subpoblaciones de NK entre derrames malignos y benignos:

Scherpereel y colaboradores⁸⁴ compararon 38 derrames pleurales malignos por adenocarcinoma, 30 benignos con lesiones pleurales asociadas a amianto, 79 mesoteliomas y 15 benignos, encontrando un aumento de CD16+ en líquido pleural en todos los grupos salvo en los benignos sin lesiones pleurales. Cornfield y colaboradores⁵⁷ analizaron 30 derrames malignos (pleurales, pericárdicos y ascíticos) y 30 benignos sin encontrar diferencias en el porcentaje de las NK totales ni en ninguna de las subpoblaciones estudiadas (NK CD16+, NK CD56 bright CD16+ y NK CD56 dim CD16+). Sólo observaron un aumento del valor absoluto (células/ μ l) de las NK CD16+ en los derrames malignos. Por otra parte, aunque no era el objetivo del trabajo⁸⁵, Pace y colaboradores encontraron que los porcentajes de las NKCD16+ de los pacientes con derrame pleural maligno y los debidos a insuficiencia cardiaca fueron similares, tanto en el líquido pleural como en la sangre periférica. En nuestro estudio, atendiendo a la intensidad de expresión de los antígenos de superficie CD56 y CD16 hemos analizado estas mismas subpoblaciones de NK, añadiendo la subpoblación NK CD57+ por su actividad citotóxica, y no encontramos diferencias entre grupos (tabla 4.12) ni entre malignos y benignos (tabla 4.18) en ninguna de las células estudiadas en el líquido pleural.

A pesar de que las NKCD57+ tienen una alta actividad citolítica⁸⁷, no hay estudios publicados sobre este marcador en el derrame pleural maligno, siendo el nuestro el primer trabajo que lo analiza.

La comparación de nuestros hallazgos con los pocos estudios existentes sobre este tema es complicada por la variabilidad de la metodología utilizada. Scherpereel y colaboradores⁸⁴ cuantificaron las células NK en función de la etiología del derrame, Cornfield y colaboradores⁵⁷ analizaron derrames pleurales, pericárdicos y ascíticos y no solamente pleurales. Nuestros datos coinciden con los de estos últimos autores, que no encontraron diferencias en el porcentaje de ninguna de las subpoblaciones de NK en líquido pleural. Respecto

a los resultados hallados por Pace y colaboradores⁸⁵, por una parte incluyeron sólo a 19 pacientes con derrame pleural maligno y por otra, el grupo de benignos (todos debidos a fallo cardiaco) es diferente al nuestro, que hay solo cuatro pacientes diagnosticados de insuficiencia cardiaca siendo el resto otras etiologías benignas.

Actualmente, son necesarios más estudios que aclaren los datos previos debido a la escasa información existente y a la importancia clínica que puede conllevar el conocimiento de las subpoblaciones de las NK en el derrame pleural maligno.

5.6.2. FENOTIPOS CELULARES EN SANGRE PERIFÉRICA

En cuanto a la celularidad linfocitaria de la sangre periférica, las subpoblaciones de las NK, tanto en el análisis por grupos como en el de malignos frente a benignos, muestran que la subpoblación CD56 dim CD16- es más alta en los benignos, y las subpoblaciones CD56 dim CD16 + y NK CD16+ aparecen mayoritariamente en el grupo conjunto de malignos y paramalignos (tabla 4.14) y en malignos aisladamente (tabla 4.20), lo que indica que una alta expresión de CD16 las hace eficientes mediadores de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo⁶⁰ con expresión en sangre pero no en líquido pleural.

Estos hallazgos del estudio hacen plantearnos si hay una respuesta sistémica más importante que la local en los pacientes con derrame pleural maligno.

5.6.3. FENOTIPOS CELULARES EN LÍQUIDO PLEURAL Y SANGRE PERIFÉRICA

Nuestros resultados se aproximan a los datos publicados con un porcentaje de linfocitos B similar en líquido pleural (6,9%) y sangre periférica (8%), un

predominio de linfocitos T en líquido pleural (80,5%) y de células NK en sangre periférica (11,6%).

Un reciente estudio⁶² sobre poblaciones linfocitarias en líquido pleural y sangre periférica de 25 pacientes con derrame pleural maligno, muestra que el porcentaje de linfocitos B era similar en ambas muestras con una media del 6%, el de linfocitos T predominó en líquido pleural (media 72%) y respecto a las células NK, igual que en las anteriores poblaciones, no hubo diferencias. Otros autores también encontraron la misma distribución de linfocitos en el líquido pleural de los derrames pleurales malignos con parecidos porcentajes: 77% linfocitos T y 6,9% linfocitos B⁸⁵.

En la misma línea que nuestros resultados, recientemente ha sido reportado que, en pacientes con cáncer pulmón y derrame pleural maligno, la media del porcentaje de células NK en líquido pleural (7,7%) fue significativamente inferior al de sangre periférica (15,2%)⁶⁴.

Se han identificado subpoblaciones de células NK dependiendo de las funciones que son capaces de realizar. Las células NK CD56 bright o reguladoras, representan un 10% de las NK circulantes en sangre, siendo más abundantes en otros tejidos, como el pleural^{62, 63, 64}. A diferencia, las NK CD56 dim o citotóxicas predominan en sangre periférica en un 90%.

Aunque se han observado NK reguladoras en tumores sólidos como el carcinoma de pulmón no células pequeñas, el carcinoma de células renales y el cáncer de mama, hay escasa información sobre las subpoblaciones y funciones de las células NK presentes en los derrames pleurales malignos de pacientes con tumores primarios y metastásicos de diversos orígenes. En este sentido, nuestros resultados muestran un predominio de las subpoblaciones NK CD56 bright, NK CD56 bright CD16- y NK CD56 bright CD16+ en líquido pleural en todos los grupos. Así mismo, también se ha observado una proporción más elevada de las NK CD56 bright en líquido pleural respecto a sangre periférica en un estudio de

15 pacientes con derrame pleural maligno⁶⁴. Recientemente se ha comparado la subpoblación definida como CD56 bright CD16 low (alta expresión del antígeno CD56 y baja del CD16) y la CD56 dim CD16+ del líquido pleural con sangre periférica en 25 pacientes (12 mesoteliomas y 13 tumores metastásicos de diferente origen) obteniendo un predominio de la primera subpoblación descrita en la pleura y de la segunda en la sangre⁶².

Tanto los datos de nuestro estudio como los de las otras series^{62, 64} apuntan que las células NK CD56 bright o reguladoras, capaces de producir grandes cantidades de citoquinas probablemente en respuesta a la estimulación tumoral, predominan en el líquido pleural en relación con la sangre periférica.

En nuestra serie, las subpoblaciones de NK con mayores porcentajes en todos los grupos en la sangre periférica son: la NK CD56 dim CD16+, NK CD56 dim y la NK CD16+. Estos resultados coinciden con los publicados en los que observan una elevada proporción de las subpoblaciones NK CD56 dim CD16+⁶², NK CD56 dim⁶⁴ y NKCD16+^{62, 84, 85} en sangre periférica.

También encontramos un predominio de la subpoblación NKCD57+ en sangre periférica respecto al líquido pleural, siendo ésta la primera vez que se describe este hallazgo.

Un solo artículo ha analizado el receptor de citotoxicidad natural NKp44 en los pacientes con derrame pleural maligno observando una baja expresión tanto en líquido pleural como en sangre periférica⁶². En nuestro estudio, aunque también encontramos una escasa expresión de NKp44 en líquido pleural, en sangre periférica está ausente en todos los grupos. Esta situación puede ser explicable porque probablemente el estudio de los receptores de citotoxicidad natural en fresco necesiten mayor sensibilidad en el citómetro de flujo para detectarlos que las poblaciones linfocitarias, es decir que esa sensibilidad sea mayor de 10^{-2} - 10^{-3} (reconocimiento de un linfocito entre 100 – 1000 células). Se ha observado un

aumento de la expresión de NKp44 cuando se cultiva con IL-2⁶² ya que las citoquinas IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18 junto con los interferones α y β activan a las células NK. Nosotros descartamos realizar estimulación con interleuquinas porque perderíamos la ventaja de la rapidez de diagnóstico que ofrece la citometría de flujo de las muestras en fresco, además de que supone un mayor coste.

5.6.4. CORRELACIÓN DE LAS POBLACIONES DE NK ENTRE LÍQUIDO PLEURAL Y SANGRE PERIFÉRICA

No hay datos en la literatura que hayan estudiado la relación de las NK y sus subpoblaciones entre el líquido pleural y sangre periférica.

Nosotros hemos encontrado correlaciones positivas significativas principalmente en los valores porcentuales de las NK totales y de las subpoblaciones NK CD56 bright CD16+ y NK CD56 dim (tabla 4.16), lo que podría indicar que la respuesta sistémica y local van en el mismo sentido, es decir cuando haya un aumento de las células NK en sangre periférica también lo habrá en el líquido pleural.

5.6.5. EFICACIA DIAGNÓSTICA DEL ANÁLISIS DE LOS FENOTIPOS CELULARES

Como se ha mencionado previamente, no es suficiente el estudio de las poblaciones linfocitarias (linfocitos B, T y células NK totales) para diferenciar derrames malignos de benignos. El análisis de las subpoblaciones NK podría ayudarnos a establecer esta diferencia por la especificidad de sus funciones, citotóxicas o reguladoras. Sin embargo, los pocos trabajos publicados son metodológicamente distintos y por tanto difíciles de comparar. En nuestros resultados, aunque no encontramos diferencias en las subpoblaciones de NK de

líquido pleural para discriminar malignos de benignos, sí las hallamos en las subpoblaciones de sangre periférica: NK CD56 dim CD16-, NK CD56 dim CD16 + y NK CD16+ (tabla 4.20). Por ello, para determinar la eficacia diagnóstica del análisis de estas subpoblaciones en sangre se ha realizado un análisis de curva COR.

Las subpoblaciones con mayor área bajo la curva son la NK CD56 dim CD16+ (0,761) y la NK CD16+ (0,757). Es decir, la determinación del porcentaje de estas subpoblaciones en sangre periférica es un test diagnóstico con una capacidad aceptable para discriminar un paciente con derrame pleural maligno de benigno. Este resultado no ha sido reportado anteriormente.

No hay trabajos publicados que hayan analizado el valor que tienen las subpoblaciones de NK en sangre periférica para diferenciar pacientes con derrame malignos de benignos, por lo que nuestro resultado no hemos podido contrastarlo con otros estudios.

5.6.6. RATIO LP/SP DE NK Y SUS SUBPOBLACIONES

Con la intención de mejorar el rendimiento diagnóstico de las subpoblaciones de NK en líquido pleural y basándonos en que el estudio de componentes de líquido pleural siempre se realiza en relación a la sangre, es muy interesante evaluar si la determinación de la ratio LP/SP de las poblaciones de NK podrían ayudar al diagnóstico del derrame pleural maligno.

Nuestros resultados muestran que la ratio LP/SP de la subpoblación CD56 bright CD16- y la de la CD56 dim CD16 - son más altas, es decir encontramos mayor porcentaje de células reguladoras y citotóxicas respectivamente en líquido pleural respecto a la sangre en los derrames pleurales malignos y paramalignos que en los benignos (tabla 4.21 y 4.22). Estos hallazgos no pueden ser sustentados con la literatura porque no se han reportado antes.

Solamente Atanackovic y colaboradores⁹² han utilizado la ratio LP/SP de NK totales (CD3- CD56+) no de subpoblaciones, para diferenciar derrames malignos de benignos. Estos autores compararon la ratio de NK líquido (pleural y peritoneal)/SP de 17 pacientes con derrame benigno (ascítico), 11 con maligno peritoneal y 16 con derrame pleural maligno observando una disminución significativa de la ratio de células NK líquido/SP en los grupos de pacientes con derrames malignos. En nuestro trabajo la ratio LP/SP de NK totales no muestra diferencias entre grupos. Ambos resultados son difíciles de comparar puesto que el grupo de los benignos es distinto, en su estudio son líquidos ascíticos debidos a cirrosis hepática mientras que en el nuestro son pleurales y además de diferentes etiologías.

Una ratio LP/SP de NK CD56 bright CD16- y NK CD56 dim CD16- elevada en los derrames malignos y paramalignos frente a los benignos, ambas sin expresión del antígeno de superficie CD16 responsable de la citotoxicidad dependiente de anticuerpo, nos hace pensar que para el diagnóstico del derrame pleural maligno y paramaligno aporta más la capacidad citotóxica espontánea o natural de las células NK, primera en actuar, que la dependiente de anticuerpo, la cual se lleva a cabo cuando el organismo ya ha desarrollado una respuesta específica humoral.

Para determinar la eficacia diagnóstica de la ratio LP/SP de estas subpoblaciones se ha realizado un análisis de curva COR, cuya área bajo la curva es de 0,757 para la ratio LP/SP de NK CD56 bright CD16- y 0,741 para la de NK CD56 dim CD16-. Por lo tanto, la determinación de la ratio LP/SP de estas subpoblaciones parece ser un test diagnóstico con una capacidad aceptable para discriminar un paciente con derrame pleural maligno y paraneopásico de benigno.

5.6.7. ÁRBOL DE DECISIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO DEL DERRAME PLEURAL DE ETIOLOGÍA DESCONOCIDA

Finalmente, puesto que el abordaje del diagnóstico del derrame pleural mejora al evaluar conjuntamente sus propias características con otras variables clínicas, radiológicas y analíticas, hemos configurado un árbol de decisión para el diagnóstico del derrame pleural maligno de nuestra serie mediante el método CHAID. Para ello se han utilizado como variables dependientes los derrames pleurales malignos, paramalignos y benignos, y como independientes, tras una metodología paso a paso, los antecedentes personales de cáncer, la disnea, la masa y el engrosamiento pleural.

El árbol de decisión de la figura 4.22 muestra que:

- La variable “MASA” es el mejor predictor para el diagnóstico del derrame pleural de etiología desconocida, con tres categorías: malignos, paramalignos y benignos.
- El 77,8% de los derrames pleurales serán malignos si cuando no hay masa pulmonar visible, existe engrosamiento pleural. Si observamos una masa pulmonar y el paciente refiere disnea la probabilidad de que sea maligno es del 66,7%, que aumenta al 78,6% si tiene antecedentes personales de cáncer.
- La mayor probabilidad de que sea paramaligno (77,8%) se da entre los pacientes que tienen masa pulmonar, pero no disnea.

Posteriormente, hemos realizado un segundo árbol de decisión incluyendo las variables cuantitativas de las pruebas realizadas en el análisis del líquido pleural categorizadas, es decir con puntos de corte establecidos mediante el método

CHAID. Se han utilizado nuevamente como variables dependientes los derrames pleurales malignos, paramalignos y benignos, y como variables independientes la disnea, masa, pH categórico (mayor o menor a 7,38) y LDH en líquido pleural categórico (mayor o menor a 169 UI/L).

Este nuevo árbol de decisión de la figura 4.23 muestra que:

- La variable “MASA” es el mejor predictor para el diagnóstico del derrame pleural de etiología desconocida, con tres categorías: malignos, paramalignos y benignos.
- La mayor probabilidad de que sea maligno en un 83,3% se da entre los que tienen masa pulmonar visible radiológicamente y un pH < 7,38 en el líquido pleural. Si el pH es $\geq 7,38$ lo más probable es que sea paramaligno en un 73,3% de los casos.
- La mayor probabilidad de que sea benigno (91,7%) se da entre los que no tienen masa pulmonar y la LDH en líquido pleural es ≤ 169 UI/L. Si tienen una LDH en líquido pleural > 169 UI/L y disnea, la probabilidad de que sea maligno aumenta hasta el 65,2%.

En resumen, estos árboles de decisión nos indican que el hallazgo de una masa pulmonar en las exploraciones realizadas al inicio del estudio es el mejor predictor para el diagnóstico de malignidad del derrame pleural. Si nos fijamos en las variables clínicas y radiológicas podemos decir que si el paciente tiene una masa pulmonar pero no disnea, lo más probable es que el derrame pleural sea paramaligno. En cambio si se acompaña de disnea aumenta la probabilidad de malignidad. Si el paciente no tiene masa pulmonar, es más probable que sea maligno cuando observamos engrosamiento pleural.

En el análisis del líquido pleural las variables que más nos aportan en la sospecha diagnóstica de malignidad son el pH y la LDH. Si el paciente tiene una masa pulmonar y un pH < 7,38 la probabilidad de que sea maligno es alta,

pero si el pH es $\geq 7,38$ probablemente sea paramaligno. Cuando un paciente no tiene masa pulmonar y la LDH en líquido pleural es ≤ 169 UI/L lo más probable es que sea benigno, pero si la LDH en líquido pleural es mayor a 169 UI/L y además asocia disnea aumenta la probabilidad de malignidad.

Según estos árboles de decisión la determinación de las poblaciones de NK en líquido pleural no incrementa la posibilidad de un diagnóstico de malignidad del derrame pleural, aunque sería necesario un mayor tamaño muestral para mejorar la significación estadística de estos resultados.

No hemos encontrado ningún árbol de decisión en la literatura que incluya el análisis de las células NK del líquido pleural. Tal como muestran las guías^{25, 28} y nuestro estudio, son los hallazgos clínicos, radiológicos y parámetros bioquímicos del líquido pleural los que ayudan a establecerlo.

5.7. SUPERVIVENCIA DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

El derrame pleural maligno es un signo de enfermedad avanzada ya que implica la afectación del espacio pleural por parte de dicho proceso maligno, además, asocia un deterioro sintomático y un empeoramiento en la calidad de vida que con frecuencia se acompaña de un mal pronóstico con una supervivencia media que varía entre 3 y 12 meses desde el momento del diagnóstico⁴⁶.

En nuestro estudio, con un seguimiento medio de $640,4 \pm 242$ días, más de la mitad de los pacientes (57,7%) fallecieron. De ellos, el 53,7% eran derrames pleurales malignos con una mediana de supervivencia de 31 días, y el 24,4% tenían derrame pleural paramaligno con una mediana de supervivencia de 72 días. Además, hemos observado una relación significativa entre el diagnóstico del derrame (maligno, paramaligno o benigno) y el tiempo de supervivencia.

Recientemente, Abrao y colaboradores han estudiado 86 pacientes con derrame pleural maligno de diversos orígenes en tratamiento paliativo, y encontraron que la mediana de supervivencia era de 127 días⁹³. Así mismo, Kasapoglu y colaboradores evaluaron 199 pacientes con derrame pleural maligno y cáncer de pulmón no células pequeñas, reportando una mediana de supervivencia de 4,4 meses⁹⁴. Sin embargo, otros autores analizan la supervivencia de 365 pacientes también con cáncer de pulmón y derrame pleural maligno al inicio del diagnóstico, y encuentran una mediana de supervivencia de 14,3 meses⁹⁵. Nuestros pacientes con derrame pleural maligno y paramaligno tienen un peor pronóstico que lo publicado en estas series. La extensión tumoral, el desarrollo del derrame pleural al diagnóstico de la enfermedad neoplásica o durante el curso de la misma, así como el retraso en iniciar el estudio del líquido pleural que se observa radiológicamente en pacientes con tumor primario derivados de otras especialidades, son causas no analizadas en este trabajo que han podido influir en la menor supervivencia hallada de nuestra población.

Debido a la elevada mortalidad de los pacientes con derrame pleural maligno sería muy útil conocer si los fenotipos celulares contribuyen al pronóstico. Nuestros resultados (tabla 4.25, 4.26 y 4.27) muestran que el cálculo de la ratio LP/SP tiene una mayor rentabilidad para establecer el pronóstico que el análisis de las subpoblaciones de NK por separado en líquido pleural o sangre periférica, siendo la ratio LP/SP de NK CD16+ y NK CD57+ las que más incrementan el riesgo de muerte (HR de 5,025 y 2,936 respectivamente).

En el derrame pleural maligno, el porcentaje de las NK CD57+, tanto en líquido pleural (aunque en éste roza la significación estadística) como en sangre periférica, es mayor en los pacientes que fallecieron durante el seguimiento (tabla 4.30 y 4.36 respectivamente). Sin embargo, en el análisis de regresión de Cox ajustado la variable que más aumenta el riesgo de mortalidad es la ratio LP/SP de la subpoblación NK CD16+ con una HR de 6,1 (tabla 4.28). Tal como

apuntan el análisis univariado y multivariado de nuestro estudio, los valores elevados de la subpoblación NK CD57+ y principalmente de la NK CD16+ tendrían un valor de mal pronóstico en los pacientes con derrame pleural maligno, hecho esperable porque ambas subpoblaciones tienen una potente actividad citotóxica.

Existen datos en relación con otros tumores y marcadores de enfermedad maligna:

Se ha publicado que la expresión de CD16+ es un factor de buen pronóstico respecto a la supervivencia de determinados tumores. Así, en un estudio de pacientes con cáncer metastásico de estómago y pulmón, la HR del porcentaje de la población denominada NK T CD16+ (CD3+ CD56+ CD16+) en sangre periférica es 0,499 (IC 95% 0,296-0,841)⁹⁶, y en otro de pacientes con cáncer colorrectal la HR del porcentaje de CD16+ en tejido fue de 0,71 (IC 95% 0,6-0,9)⁹⁷.

Solamente un artículo⁹⁸ ha descrito la subpoblación NK CD16+ en derrames malignos, analizando 73 (53 peritoneales y 20 pleurales), la mayoría por cáncer de ovario, y observaron que la presencia de NK CD16+ en líquido pleural y peritoneal se asoció a peor supervivencia por Kaplan-Meier respecto a los que tenían NK CD16-. Sin embargo, en el análisis de regresión de Cox ajustado, sólo el estadio tumoral fue predictor de supervivencia.

En resumen, la subpoblación NK CD16+, citotóxica, tiene un papel en el pronóstico en los pacientes con cáncer. Según lo publicado, esta subpoblación de NK en sangre periférica y tejido (cáncer) es un factor pronóstico favorable. Sin embargo, tal como sucede en nuestra serie, en derrames malignos se asocia a peor supervivencia. Basándonos en que la afectación neoplásica de la pleura implica enfermedad avanzada y mal pronóstico, probablemente cuando

aumentan las células NK CD16+ en líquido pleural el paciente tiene ya mucha carga tumoral.

En la actualidad no hemos encontrado ningún estudio sobre el valor pronóstico de la subpoblación NK CD57+ en líquido pleural en los pacientes con derrame pleural maligno. Villegas y colaboradores⁹⁹ analizaron si las células NK CD57+ que infiltraron los carcinomas escamosos de pulmón influyeron en la supervivencia de los pacientes que se habían intervenido. El riesgo de muerte de los pacientes con menos de cinco células NK CD57+ por campo fue 2,5 veces más alto que aquellos con más de cinco por campo. Es decir, los pacientes con un número más alto de células NK CD57+ asociadas a tumor tuvieron mejor pronóstico, lo que indicaría que la respuesta citotóxica local sobre un tumor pulmonar en estadio quirúrgico es efectiva, y por tanto, implica mayor supervivencia. Sobre el derrame pleural maligno esta respuesta citotóxica también está presente pero, debido a la importante carga tumoral existente en este estadio de la enfermedad, ya no es lo suficientemente eficiente para mejorar el pronóstico de estos pacientes.

Puesto que un número elevado de células NK CD57+ en tejido se asocian a mayor supervivencia y no hay información disponible en la literatura sobre el significado pronóstico de esta subpoblación de NK en líquido pleural que nuestros resultados apuntan a un peor pronóstico, son necesarios más estudios que corroboren estos hallazgos.

5.7.1. ÁRBOL DE DECISIÓN PARA EL PRONÓSTICO DEL DERRAME PLEURAL DE ETIOLOGÍA DESCONOCIDA

En nuestra población, la supervivencia de los pacientes con derrame pleural maligno o paramaligno no supera el 10% a los tres meses. Nos planteamos configurar un árbol de decisión mediante el método CHAID que aproxime al

pronóstico del derrame pleural de etiología desconocida. Para ello, se ha utilizado como variable dependiente el éxito y como independientes la presencia de masa pulmonar, astenia y la ratio LP/SP de CD56dim CD16+.

El árbol de decisión de la figura 4.25 muestra que:

- La variable “MASA” es el mejor predictor para el pronóstico del derrame pleural de etiología desconocida, con dos categorías: que sea o no éxito.
- La mayor probabilidad de que sea éxito en un 100% de los casos se da entre los pacientes que tienen masa pulmonar visible y astenia.
- La probabilidad más alta de que sobrevivan (92,9%) se da entre los que no tienen masa pulmonar visible y la ratio LP/SP de NK CD56dim CD16+ es $\leq 0,43$.

Este árbol nos indica que la masa pulmonar es el mejor predictor para el pronóstico del derrame pleural de etiología desconocida. Si nos fijamos en las variables clínicas y radiológicas podemos decir que cuando el paciente tiene una masa pulmonar y astenia probablemente fallecerá. Sin embargo, si no hay masa pulmonar en el TAC y la ratio LP/SP de la subpoblación NK CD56dim CD16+ está disminuida, lo más probable es que tenga mayor supervivencia.

El carcinoma de pulmón es la causa más frecuente de derrame pleural maligno⁹¹. Cuando metastatiza a pleura se asocia a mal pronóstico con un tiempo de supervivencia de sólo unos meses²⁸, por lo tanto, en pacientes con derrame pleural la presencia de una masa pulmonar en el TAC y astenia (uno de los síntomas del síndrome constitucional) indican una mayor probabilidad de fallecer en poco tiempo.

No hemos encontrado en la literatura un árbol de decisión sobre el pronóstico que incluya el análisis de las células NK del líquido pleural por lo que no podemos comparar nuestros resultados. Según nuestro árbol, cuando la ratio

LP/SP de la subpoblación NK CD56 dim CD16+ (citotóxica) es $\leq 0,43$, punto de corte establecido mediante CHAID, tendrá mayor supervivencia debido probablemente a que la presencia de menos células NK citotóxicas en líquido indica una menor carga tumoral en la cavidad pleural, aunque sería necesario aumentar el tamaño de la muestra para mejorar la significación estadística de nuestros resultados.

5.8. LIMITACIONES DEL TRABAJO

La principal limitación de este estudio podría ser el hecho de que hay una considerable proporción (21,1%) de los derrames pleurales incluidos que son paramalignos. Otros estudios^{57, 85} no incluyen este grupo de pacientes debido probablemente a que el comportamiento de este derrame no es tan claro como el de uno maligno o benigno. Puesto que tiene características propias, se asocia a mal pronóstico y está presente en una proporción de pacientes con tumores primarios, decidimos incluirlos para reflejar la práctica clínica habitual. Sin embargo, aunque hemos aumentado el tamaño muestral calculado inicialmente, probablemente necesitaríamos un mayor número de derrames pleurales malignos para obtener resultados más concluyentes sobre el valor de analizar las NK y sus subpoblaciones.

Otra limitación que nos hemos encontrado es la bibliografía inexistente, escasa o metodológicamente diferente que ha dificultado comparar nuestros resultados, que por otra parte son inéditos hasta ahora.

5.9. IMPLICACIONES CLÍNICAS

Como ya hemos comentado, la citometría de flujo es una técnica que permite un análisis rápido, preciso y reproducible de las células del líquido pleural

pudiendo complementar a la citología y podría formar parte de nuestra práctica clínica habitual.

No obstante, el valor del análisis aislado de las poblaciones linfocitarias en los derrames pleurales, sean malignos o benignos, no está clara en la literatura. Actualmente, son necesarios más estudios que aclaren el papel que pudieran tener el estudio de los diferentes fenotipos celulares en el diagnóstico de malignidad del derrame pleural. La escasa información existente dificulta valorar la importancia clínica que podría conllevar el conocimiento de las subpoblaciones de las NK del líquido pleural en pacientes con derrame pleural maligno. Sin embargo, nuestros resultados coinciden con la bibliografía en que hay una proporción más elevada de las subpoblaciones NK CD56 bright o reguladoras con alta capacidad de producción de citoquinas en líquido pleural respecto a sangre periférica en el derrame pleural maligno, situación que se produce cuando las células NK migran a la cavidad pleural en respuesta al estímulo causado por las células tumorales.

Respecto al receptor de citotoxicidad natural NKp44, nuestros resultados muestran que no aporta valor ni al diagnóstico ni al pronóstico del derrame pleural ya que tiene escasa expresión en líquido pleural y nula en sangre periférica en todos los grupos de pacientes estudiados.

La ratio LP/SP de determinadas poblaciones de NK reguladoras y citotóxicas (NK CD56 bright CD16- y NK CD56 dim CD16 -) podría ayudar a discriminar pacientes con derrame pleural maligno y paramaligno de benigno.

Dada la baja supervivencia de los pacientes con derrame pleural maligno en el momento de su diagnóstico, sería muy útil conocer si los fenotipos celulares existentes en el líquido pleural contribuyen al pronóstico. Existe escasa literatura al respecto. Nosotros hemos encontrado que la subpoblación NK

CD16+, citotóxica, parece tener un papel en el pronóstico de los pacientes con derrame pleural maligno.

En la práctica clínica habitual, es necesario tener en cuenta variables clínicas, radiológicas y analíticas del líquido pleural tanto en el diagnóstico como para establecer un pronóstico del derrame pleural de etiología desconocida. Además, el árbol de decisión nos indica que la ratio LP/SP de una subpoblación de NK citotóxica, la NK CD56 dim CD16+, también podría aportar valor al pronóstico de los pacientes con esta patología.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

A la vista de nuestros resultados, podemos concluir:

1. La determinación aislada del porcentaje de células NK en líquido pleural de los derrames pleurales de etiología desconocida no permite diferenciar entre malignos y benignos. Tampoco la de sus subpoblaciones incluyendo las que tienen función citotóxica.
2. La determinación aislada del porcentaje en sangre periférica de las subpoblaciones NK CD56 dim CD16+ y NK CD16+, con función citotóxica dependiente de anticuerpo, es un test diagnóstico con una capacidad aceptable para discriminar un paciente con derrame pleural maligno de benigno, lo que sugiere una respuesta sistémica al tumor más que una respuesta local.
3. La ratio LP/SP de las NK CD56 bright CD16- y NK CD56 dim CD16 -, poblaciones de NK reguladora y citotóxica respectivamente sin expresión del antígeno de superficie CD16 responsable de la citotoxicidad dependiente de anticuerpo, tienen una capacidad diagnóstica aceptable para discriminar un derrame pleural maligno o paramaligno del benigno.
4. El receptor de citotoxicidad natural NKp44, específico de la célula NK activada, no aporta valor al diagnóstico ni al pronóstico en los pacientes con derrame pleural, tampoco en el derrame pleural maligno.
5. El mejor factor pronóstico de mortalidad en los pacientes con derrame pleural maligno es la ratio LP/SP de la subpoblación NK CD16+ (citotóxica dependiente de anticuerpo) incrementando el riesgo de muerte 6,1 veces.

6. La combinación de los hallazgos clínicos, radiológicos y de bioquímica del líquido pleural ayudan a establecer el diagnóstico de malignidad del derrame pleural. El análisis de la celularidad pleural no incrementa la posibilidad de un diagnóstico de malignidad en el árbol de decisión.
7. En cuanto al pronóstico, son los hallazgos clínicos (astenia), radiológicos (masa pulmonar) y una disminución de la ratio LP/SP de la subpoblación NK CD56 dim CD16+ (citotóxica), las variables que más influyen para establecer el pronóstico del derrame pleural.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Segado A, Rodríguez Panadero F. Fisiopatología de la pleura: Manejo del derrame pleural. En Caminero JA, Fernández Fau L editores. Manual de Neumología y Cirugía Torácica. SEPAR. Madrid. 1998; 1671-1684.
2. Fraser RS, Müller NL, Colman N, Paré PD. El sistema linfático de los pulmones, la pleura y el mediastino. En: Fraser-Paré, ed. Diagnóstico de las enfermedades del tórax. Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A; 2002; 171-193.
3. Wang NS. Mesothelial cells in situ. Chrétien J, Bignon J, Hirsch A, eds. The Pleura in Health and Disease. New York: Dekker; 1985; 23-38.
4. Li J. Ultrastructural study on the pleural stomata in human. Punct Dev Morphol 1993; 3: 277-282.
5. Albertine KH, Wiener-Kronish JP, Staub NC. The structure of the parietal pleura and its relationship to pleural liquid dynamics in sheep. Anat Rec 1984; 208: 401-409.
6. Broaddus VC, Light RW. Disorders of the pleura: General principles and diagnostic approach. En: Murray JF, Nadel JA, eds. Respiratory Medicine. Second edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1994; 2145-2163.
7. Kinasewitz GT. Pleural fluid dynamics and effusions. En: Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders. Third edition. McGraw-Hill Companies; 1998; 1389-1409.
8. Sahn SA. The pleura. Am Rev Respir Dis 1988; 138: 184-234.

9. Chillón Martín MJ. Embriología, anatomía y fisiología pleural. En Pérez Rodríguez E, Villena Garrido MV editores. Enfermedades de la pleura. Neumomadrid. 2003; 11-16.
10. Noppen M. Normal volume and cellular contents of pleural fluid. *Curr Opin Pulm Med* 2001; 7: 180-182.
11. Wiener-Kronish JP, Albertine KH, Licko V, Staub NC. Protein egress and entry rates in pleural fluid and plasma in sheep. *J Appl Physiol* 1984; 54: 459-463.
12. Staub NC, Wiener-Kronish JP, Albertine KH. Transport through the pleura: Physiology of normal liquid and solute exchange in the pleural space. En: Chrétien J, Brignon J, Hirsch A, eds. New York: The Pleura in Health and Disease; 1985; 169-193.
13. Broaddus VC, Wiener-Kronish JP, Berthiaume Y, Staub NC. Removal of pleural liquid and protein by lymphatics in awake sheep. *J Appl Physiol* 1988; 64: 384-390.
14. Light RW. Pleural Diseases. Ed Baltimore: Williams & Wilkins; 1995.
15. Villena Garrido V, Ferrer Sancho J, Hernández Blasco L, de Pablo Gafas A, Pérez Rodríguez E, Rodríguez Panadero F, et al. Diagnóstico y tratamiento del derrame pleural. *Arch Bronconeumol* 2006; 42:349-372.
16. Martínez-Berganza Asensio AJS. Manifestaciones Clínicas. Enfermedades de la Pleura. Ed. CEA, S.A. (Grupo JARPYO Editores). Madrid. 1989; 45-47.
17. Pérez Rodríguez E, Villena Garrido V, Melchor Iñiguez R. Derrame Pleural. Manual de Neumología Clínica. En: de Lucas Ramos P, Jiménez Ruiz CA, Pérez Rodríguez E, eds. Madrid. 1999; 267-285.

18. Smyrnios NA, Jederlinic PJ, Irwin RS: Pleural effusion in an asymptomatic patient. Spectrum and frequency of causes and management considerations. *Chest* 1990; 97: 192-196.
19. Hessén L. Roentgen examination of pleural fluid: A study of the localization of free effusion: The potentialities of diagnosing minimal quantities of fluid and its existence under physiological conditions. *Acta Radiol* 1951; 86 (suppl).
20. McLoud TC, Flower CDR. Imaging the pleura. Sonography, CT and MR imaging. *AJR Am J Roentgenol* 1991; 156: 1145-1153.
21. Blackmore CC, Black WC, Dallas RV, et al. Pleural fluid volume estimation: a chest radiograph prediction rule. *Acad Radiol* 1996;3:103-109.
22. Gordon CE, Feller-Kopman D, Balk EM, Smetana GW. Pneumothorax following thoracentesis. A systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2010; 170: 332-339.
23. Kreef L. Computed tomography of the lungs and pleura. *Semin Roentgenol* 1978; 13: 213-225.
24. Pugatch RD, Faling IJ, Robbins AH, Zinder GL. Differentiation of pleural and pulmonary lesions using computed tomography. *J Comput Assist Tomogr* 1978; 2: 601-606.
25. Hooper C, Lee YCG, Maskell N. Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society pleural disease guideline 2010. *Thorax* 2010;65: Suppl 2:ii4-17.
26. Light RW. Thoracentesis (diagnostic and therapeutic) and pleural biopsy. En: Light RW, ed. *Pleural diseases* (4th ed.). Baltimore: Williams and Wilkins; 2001; 358-377.

27. García Luján R, Villena Garrido V, Montoro Zulueta FJ, Verdugo Cartas MI, López Encuentra A, Martín Escribano, P. Estudio del derrame pleural de aspecto hemático. *Arch Bronconeumol* 2002; 38: 163.
28. Villena Garrido V, Cases Viedma E, Fernández Villar A, de Pablo Gafas A, Pérez Rodríguez E, Porcel Pérez JM, et al. Normativa sobre el diagnóstico y tratamiento del derrame pleural. Actualización. *Arch Bronconeumol* 2014; 50:235-249.
29. Light RW, MacGregor MI, Luchsinger PC, Ball WC Jr. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med* 1972; 77: 507-513.
30. Bielsa S, Porcel JM, Castellote J, Mas E, Esquerda A, Light RW. Solving the Light's criteria misclassification rate of cardiac and hepatic transudates. *Respirology* 2012; 17: 721-726.
31. Broaddus VC. Diuresis and transudative effusions. Changing the rules of the game. *Am J Med* 2001; 110: 732-735.
32. Romero-Candeira S, Fernández C, Martín C, Sánchez-Payá J, Hernández L. Influence of diuretics on the concentrations of proteins and other components of pleural transudates in patients with heart failure. *Am J Med* 2001; 110: 681-686.
33. Cheng DS, Rodríguez RM, Rogers J, et al. Comparison of pleural fluid pH values obtained using blood gas machine, pH meter, and Ph indicatorstrip. *Chest* 1998; 114: 1368-1372.
34. Castro DJ, Díaz G, Pérez-Rodríguez E, Prieto E, Yusen RD. Modification of pleural fluid pH by local anesthesia. *Chest* 1999; 116: 399-402.

35. Sahn SA, Good JT Jr. Pleural fluid pH in malignant effusions: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Ann Intern Med* 1988; 108: 345-349.
36. Heffner JE, Nietert PJ, Barbieri C. Pleural fluid pH as a predictor for survival for patients with malignant pleural effusions. *Chest* 2000; 117: 79-86.
37. Heffner JE, Nietert PJ, Barbieri C. Pleural fluid pH as a predictor of pleurodesis failure: analysis of primary data. *Chest* 2000; 117: 87-95.
38. Rodríguez-Panadero F, López Mejías J. Survival time of patients with pleural metastatic carcinoma predicted by glucose and pH studies. *Chest* 1989; 95: 320-324.
39. Jiménez Castro D. Parámetros del fluido pleural, procesamiento, interpretación y tipos de diagnóstico. En Pérez Rodríguez E, Villena Garrido MV editores. *Enfermedades de la pleura*. Neumomadrid. 2003; 23-31.
40. Romero S, Martín C, Hernández L, Verdú J, Trigo C, Pérez-Mateo M, Alemany L. Chylothorax in cirrhosis of the liver: analysis of its frequency and clinical characteristics. *Chest* 1998; 114: 154-159.
41. Garcia L. The value of multiple fluid specimens in the cytological diagnosis of malignancy. *Mod Pathol* 1994; 7: 665-668.
42. Anthony VB, Loddenkemper R, Astoul P, Boutin C, Goldstraw P, Hott J, et al. ERS/ATS Statement. Management of malignant pleural effusions. *Eur Respir J* 2001; 18: 402-419.
43. Jiménez D, Pérez Rodríguez E, Díaz G, et al. Determining the optimal number of specimens to obtain with needle biopsy of the pleura. *Respir Med* 2002; 96:14-17.

44. Metintas M, Ak G, Dundar E, Yildirim H, Ozkam R, Kurt E, et al. Medical thoracoscopy vs CT scan-guided Abrams pleural needle biopsy for diagnosis of patients with pleural effusions. *Chest* 2010; 137:1362-1368.
45. American Thoracic Society. Management of malignant pleura effusions. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1987-2001.
46. Roberts ME, Neville E, Berrisford RG, Antunes G, Ali NJ. Management of a malignant pleural effusion: British Thoracic Society pleural disease guideline 2010. *Thorax* 2010;65: Suppl 2:ii32-40.
47. Thomas JM, Musani AI. Malignant pleural effusions: a review. *Clin Chest Med* 2013; 34:459-471.
48. Liang QL, Shi HZ, Qin XJ, Liang XD, Jiang J, Yang HB. Diagnostic accuracy of tumour markers for malignant pleural effusion: a meta-analysis. *Thorax* 2008; 63: 35-41.
49. Shi HZ, Liang QL, Jiang J, Qin XJ, Yang HB. Diagnostic value of carcinoembryonic antigen in malignant pleural effusion: a meta-analysis. *Respirology* 2008; 13: 518-527.
50. Shen YC, Liu MQ, Wan C, Chen L, Wang T, Wen FQ. Diagnostic accuracy of vascular endothelial growth factor for malignant pleural effusion: a meta-analysis. *Exp Ther Med* 2012; 3:1072-1076.
51. Motherby H, Nadjari B, Friegel P, Kohaus J, Ramp U, Böcking A. Diagnostic accuracy of effusion cytology. *Diagn Cytopathol* 1999; 20: 350-357.
52. Stonesifer KJ, Xiang JH, Wilkinson EJ, Benson NA, Braylan RC. Flow cytometric analysis and cytopathology of body cavity fluids. *Acta Cytol.* 1987; 31: 125-130.

53. Davidson B, Dong HP, Holth A, Berner A, Risberg B. Flow cytometric immunophenotyping of cancer cells in effusion specimens: diagnostic and research applications. *Diagn Cytopathol* 2007; 35: 568-578.
54. Saha I, Dey P, Vohra H, et al. Role of DNA flow cytometry and image cytometry on effusion fluid. *Diagn Cytopathol* 2000; 22: 81-85.
55. Kumar UN, Dey P, Mondal AK, et al. DNA flow cytometry and bladder irrigation cytology in detection of bladder carcinoma. *Diagn Cytopathol* 2001; 24: 153-156.
56. Bisht B, Handa U, Mohan H, Lehl SS. Complementary value of DNA flow cytometry and image morphometry in detection of malignant cells in effusion fluids. *Malays J Pathol* 2014; 36: 83-90.
57. Cornfield DB, Gheith SM. Flow cytometric quantitation of natural killer cells and T lymphocytes expressing T-cell receptors alpha/beta and gamma/delta is not helpful in distinguishing benign from malignant body cavity effusions. *Cytometry B Clin Cytom* 2009; 76: 213-217.
58. Díaz Martín D, Prieto Martín A, Úbeda Cantera M, Álvarez-Mon Soto M. Linfocitos T. Actualización. *Medicine* 2013; 11: 1699-1709.
59. Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1205-1211.
60. Monserrat Sanz J, García Torrijos C, Díaz Martín D, Prieto Martín A. Linfocitos natural killer. Actualización. *Medicine* 2013; 11: 1728-1736.
61. Suzuki N, Bianchi E, Bass H, Suzuki T, Bender J, Pardi R, et al. Natural killer lines and clones with apparent antigen specificity. *J Exp Med* 1990; 172: 457-462.

62. Vacca P, Martini S, Garelli V, Passalacqua G, Moretta L, Mingari M. C. NK cells from malignant pleural effusions are not anergic but produce cytokines and display strong anti-tumor activity on short-term IL-2 activation. *Eur J Immunol* 2013; 43: 550-561.
63. Terme M, Fridman WH, Tartour E. NK cells from pleural effusions are potent antitumor effector cells. *Eur J Immunol* 2013; 43: 331-334.
64. Qi J, Li D, Feng J, Yang S, Su Y, Fang M, et al. Native soluble carcinoembryonic antigen is not involved in the impaired activity of CD56 natural killer cells in malignant pleural effusion. *Respiration* 2013; 86: 216-223.
65. Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56 bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 2009; 126: 458-465.
66. Sedlmayr P, Schallhammer L, Hammer A, Wilders-Truschnig M, Wintersteiger R, Dohr G. Differential phenotypic properties of human peripheral blood CD56dim+ and CD56bright+ natural killer cell subpopulations. *Arch Allergy Immunol* 1996; 110: 8-13.
67. Manara GC, Ferrari C, De Panfilis G. HNK-1 antigen is not specific for natural killer cells. *J Invest Dermatol* 1988; 91: 374-375.
68. Focosi D, Bestagno M, Burrone O, Petrini M. CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency. *J Leukoc Biol* 2010; 87: 107-116.
69. Lopez-Vergès S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56 dim CD16+ NK-cell subset. *Blood* 2010; 116: 3865-3874.

70. Krishnaraj R, Blandford G. Age-associated alterations in human natural killer cells. 2. Increased frequency of selective NK subsets. *Cell Immunol* 1988; 114: 137-148.
71. Chidrawar SM, Khan N, Chan YL, Nayak L, Moss PA. Ageing is associated with a decline in peripheral blood CD56bright NK cells. *Immun Ageing* 2006; 3:10.
72. Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 656-663.
73. Roda-Navarro P, Fernández-Ruiz E. Células natural killer. Concepto. Mecanismos de activación. Capacidades funcionales. Mecanismos de citotoxicidad. Actualización. *Medicine* 2005; 9: 2174-2180.
74. Green LK, Griffin J. Increased natural killer cells in fluids. A new, sensitive means of detecting carcinoma. *Acta Cytol* 1996; 40: 1240-1245.
75. Yu GH, Hida CA, Salhany KE, Baloch Z, Gupta PK. Immunohistochemical detection of cytotoxic lymphocytes in malignant serous effusions. *Diagn Cytopathol* 1999; 21: 18-21.
76. Laurini JA, Garcia A, Elsner B, Bellotti M, Rescia C. Relation between natural killer cells and neoplastic cells in serous fluids. *Diagn Cytopathol* 2000; 22: 347-350.
77. Sikora J, Dworacki G, Trybus M, Batura-Gabryel H, Zeromski J. Correlation between DNA content, expression of Ki-67 antigen of tumor cells and immunophenotype of lymphocytes from malignant pleural effusions. *Tumor Biol* 1998; 19: 196-204.

78. Jezewska E, Sikora J, Slowik-Gabryelska A, Zeromski J. Evaluation of immunophenotype of lymphoid cells isolated from malignant pleural effusions. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1993; 41: 51-56.
79. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:197-223.
80. Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J* 2004; 23: 255-259.
81. Memoria anual [del] Departamento de Salud Valencia-Doctor Peset, 2012. Valencia: Conselleria de Sanitat, 2013. [Consultado el 05-09-2015] Disponible en: http://publicaciones.san.gva.es/publicaciones/documentos/MemoriaDS_VDPeset_2012.pdf
82. Romero Candeira S, Hernández Blasco L, Martín Serrano C, Pantaleón Márquez C, Bernabé Sánchez E. Toracocentesis diagnóstica y evacuadora. En Villena Garrido V editores. *Manual SEPAR de Procedimientos. Módulo 8. Procedimientos en Patología Pleural - I*. Barcelona. 2005; 5-19.
83. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset. *Blood*. 2001; 97: 3146-3151.
84. Scherpereel A, Grigoriu BD, Noppen M, Gey T, Chahine B, Baldacci S, et al. Defect in recruiting effector memory CD8+ T-cells in malignant pleural effusions compared to normal pleural fluid. *BMC Cancer* 2013; 13: 324.

85. Pace E, Di Sano C, Ferraro M, Tipa A, Olivieri D, Spatafora M, et al. Altered CD94/NKG2A and perforin expression reduce the cytotoxic activity in malignant pleural effusions. *Eur J Cancer* 2011; 47: 296-304.
86. Jiménez Hiscock L, Bravo Bravo JL, Zapatero Gaviria J. Diagnóstico y manejo del derrame pleural maligno. *Rev Patol Respir* 2007; 10: 140-145.
87. Nielsen CM, White MJ, Goodier MR, Riley EM. Functional significance of CD57 expression on human NK cells and relevance to disease. *Front Immunol* 2013; 9; 4: 422.
88. Izquierdo Patrón M, Villena Garrido V, Sánchez Hernández IM, Granda Orive JI. Derrames pleurales malignos. En Pérez Rodríguez E, Villena Garrido MV editores. *Enfermedades de la pleura. Neumomadrid*. 2003; 95-123.
89. Porcel-Pérez JM, Vives Soto M, Esquerda Serrano A, Jover Sáenz A. Cutoff values of biochemical tests on pleural fluid: their usefulness in differential diagnosis of 1,040 patients with pleural effusion. *An Med Interna* 2004; 21:113-117.
90. Romero Candeira S, Hernández Blasco L, Romero Brufao S. Trasudados vs exudados pleurales. Criterios discriminantes. Causas de trasudado pleural y aproximación diagnóstica. En Pérez Rodríguez E, Villena Garrido MV editores. *Enfermedades de la pleura. Neumomadrid*. 2003; 57-68.
91. Porcel JM, Esquerda A, Vives M, Bielsa S. Etiología del derrame pleural: análisis de más de 3.000 toracocentesis consecutivas. *Arch Bronconeumol* 2014; 50: 161-165.

92. Atanackovic D, Block A, de Weerth A, Faltz C, Hossfeld DK, Hegewisch-Becker S. Characterization of effusion-infiltrating T cells: benign versus malignant effusions. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2600-2608.
93. Abrao FC, de Abreu IR, Fogarolli M, Caxeiro G, Bezerra CB, de Cerqueira Cesar FP, et al. Prognostic Factors of 30-Day Mortality After Palliative Procedures in Patients with Malignant Pleural Effusion. *Ann Surg Oncol* 2015; 22: 4083-4088.
94. Kasapoglu US, Arınç S, Gungor S, Irmak I, Guney P, Aksoy F, et al. Prognostic factors affecting survival in non-small cell lung carcinoma patients with malignant pleural effusions. *Clin Respir J* 2015 doi: 10.1111/crj.12292.
95. Wu SG, Yu CJ, Tsai MF, Liao WY, Yang CH, Jan IS, et al. Survival of lung adenocarcinoma patients with malignant pleural effusion. *Eur Respir J* 2013; 41: 1409-1418.
96. Park BG, Park CJ, Yoon CH, Jang S, Chi HS, Ryu MH, et al. The extended leukocyte differential count using the Cytodiff flow cytometric system reveals that higher CD16+ cytotoxic NK+T lymphocyte levels predict superior survival outcomes in patients with metastatic carcinoma. *Cytometry B Clin Cytom* 2013; 84: 202-204.
97. Sconocchia G, Zlobec I, Lugli A, Calabrese D, Iezzi G, Karamitopoulou E, et al. Tumor infiltration by FcγRIII (CD16)+ myeloid cells is associated with improved survival in patients with colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 2011; 128: 2663-2672.

98. Dong HP, Elstrand MB, Holth A, Silins I, Berner A, Trope CG, et al. NK- and B-cell infiltration correlates with worse outcome in metastatic ovarian carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2006; 125: 451-458.
99. Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jiménez R, Chillón MJ, Jareño J, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 2002; 35: 23-28.

ANEXO 1: HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL ESTUDIO: Valor de las subpoblaciones de las células natural killer y del receptor de citotoxicidad natural NKp44 como biomarcadores de malignidad en derrames pleurales.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. Susana Herrera Lara.

CENTRO: Hospital Universitario Dr. Peset (Servicios de Neumología y Hematología).

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del hospital que es el encargado de revisar los estudios de investigación a fin de garantizar el rigor científico del mismo y las condiciones éticas y legales que protegen los derechos y el bienestar de los pacientes.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno antes de firmar este documento.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar su consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en el diagnóstico y tratamiento de su enfermedad.

NATURALEZA Y PROPÓSITO DEL ESTUDIO

Le proponemos unirse a este estudio porque usted tiene en la radiografía de tórax un derrame pleural (líquido en la cavidad pleural) de origen todavía no conocido por lo que debe someterse a un análisis del líquido para poder precisar a qué se debe y darle el tratamiento más adecuado. Aprovechando las muestras de líquido que obtendremos en ese estudio imprescindible para saber la causa de su derrame, realizaremos el análisis de determinadas células (se llaman NK) y de sus marcadores con el fin de estudiar si este análisis que va más allá del rutinario, aumenta la posibilidad de establecer la causa del derrame pleural que padece, con el objetivo de obtener un diagnóstico más precoz y poder iniciar intervenciones terapéuticas lo antes posible.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Para el estudio del derrame pleural es necesario realizarle una toracocentesis diagnóstica (extracción de líquido pleural); si con esta primera técnica no obtenemos el diagnóstico, los siguientes pasos serían la biopsia pleural ciega y la toracoscopia. La información precisa de cada procedimiento así como los consentimientos informados de dichas técnicas se le entregarían antes de realizarle cualquiera de ellas, con independencia de su participación en este estudio. Este es el protocolo de estudio estándar ante cualquier derrame pleural, por tanto no se realizarán otros procedimientos invasores que no sean los habituales.

El mismo día que se realice la toracocentesis diagnóstica, se realizará un análisis de sangre en el que, además de comprobar que no hay alteraciones en su coagulación que contraindicarían el procedimiento, se va a determinar mediante citometría de flujo (técnica que permite un análisis rápido, preciso y reproducible de las células) la presencia de células NK (implicadas en los

mecanismos de defensa del cuerpo humano), y su receptor de citotoxicidad natural NKp44 (que expresa la actividad de las células NK), motivo de este estudio.

Así mismo, se le realizará una extracción de sangre para serología de VIH, todo ello con el propósito de descartar que esta infección no detectada interfiera en los resultados del estudio.

RIESGOS E INCONVENIENTES

Su participación en el estudio no incrementa el riesgo de ninguno de los procedimientos que, de manera habitual, son necesarios para establecer la causa del derrame pleural que padece.

POSIBLES BENEFICIOS DEL ESTUDIO

La información de este estudio ayudará a conocer si existen alteraciones en la cantidad y expresión de las células NK en los derrames pleurales malignos frente a los benignos, y de ser así, poder iniciar intervenciones terapéuticas más precozmente con el objetivo de mejorar el pronóstico de su enfermedad.

CONFIDENCIALIDAD

Si usted accede a participar, debe saber que sus datos personales y de su situación clínica así como los resultados del estudio serán recogidos y guardados de forma anónima y disociada, vinculándose a un código (número de paciente).

Sus datos serán incorporados a una base de datos informatizada de manera que la información que se obtenga no pueda asociarse a persona identificada o

identificable. Ningún dato será accesible a ninguna persona que no sea investigador de este estudio, ni podrán ser divulgados por ningún medio, garantizando en todo momento la confidencialidad de la relación médico-paciente (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos Personales).

La información recogida podría ser revisada por profesionales dependientes de las Autoridades Sanitarias, miembros del Comité Ético de Investigación Clínica y otras personas designadas por la ley para comprobar que el estudio se está llevando a cabo correctamente.

COMPENSACIÓN ECONÓMICA

Su participación en el estudio no le supondrá ningún gasto, así como tampoco le proporcionará ninguna compensación económica.

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL ESTUDIO: Valor de las subpoblaciones de las células natural killer y del receptor de citotoxicidad natural NKp44 como biomarcadores de malignidad en derrames pleurales.

Yo,.....

(Nombre y apellidos del paciente)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

.....

(Nombre y apellidos del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

- Por todo ello, presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

- Accedo a que las muestras de sangre y líquido pleural obtenidas para el estudio puedan ser utilizadas en un futuro para nuevos análisis relacionados con la enfermedad no previstos en el protocolo actual.

- Doy mi consentimiento para que se pongan en contacto conmigo para recoger información sobre mi estado de salud.

Firma del paciente:

Firma del investigador:

Nombre:

Nombre:

Fecha:

Fecha:

ANEXO 2: BECA OTORGADA AL PROYECTO

Nuestro agradecimiento al apoyo recibido de la Fundación de Neumología de la Comunidad Valenciana que ha otorgado la beca “Investigador Joven” en la convocatoria de 2012 para la realización de este estudio. La dotación económica de esta beca ha sido íntegramente destinada a la adquisición de material de laboratorio para la determinación del panel de anticuerpos monoclonales en líquido pleural y sangre de los pacientes.

No hubo conflicto de intereses.