



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMAS DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**UTILIDAD DEL LÍQUIDO PLEURAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE
NEOPLASIAS PRIMARIAS Y METASTÁSICAS PULMONARES Y
EXTRAPULMONARES A PLEURA, EN EL SERVICIO DE NEUMOLOGÍA DEL
HOSPITAL DR. R.A. CALDERÓN GUARDIA DEL 01 DE ENERO DEL 2019 AL 31
DE AGOSTO DEL 2021**

**Trabajo final de graduación para optar por el grado y título de
Especialista en Neumología**

DRA. MAGDA CAMACHO ALVARADO

TUTORA DE TESIS: DRA. MELISSA MASÍS QUESADA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica, 2022

Dedicatorias

A mi hija Daniela, mis padres, a mi esposo Sergio y mi Kiarita:

Porque su amor me hace fuerte, me da valor para enfrentar todo,

Para perseverar,

Por ser el motor de vida,

la razón de mi despertar cada día.

Porque gracias a su apoyo y sus oraciones me hacen ser quien soy.

Los AMO

A Pablo Lara:

Porque creíste en mí a ciegas,

me enseñaste a caminar,

caminaste conmigo e

incluso me impulsabas para siempre dar más.

Agradecimientos

-A mi Padre Celestial, por ser mi guía, mi fortaleza, por escuchar mis plegarias, porque sin Él nada soy, pero junto a Ti, todo lo puedo. Porque me hiciste realidad esta meta.

-A mi “mamá de neumo”, la Dra. Rocha, por darme la mano siempre y nunca soltarme, cuidar y custodiar mi aprendizaje, por enseñarme a creer en mí aun cuando ni yo lo hacía.

-A mi directora de tesis, Meli, gracias por enseñarme con tanta dulzura, por tu cariño, tu apoyo, tu comprensión, tu tiempo, por ser mi ejemplo a seguir y por hacer realidad este trabajo.

-Al Dr. Guadamuz por convertirse en mi maestro, enseñarme tanto, corregirme, escucharme, entenderme, motivarme, por su confianza y siempre brindarme una segunda oportunidad.

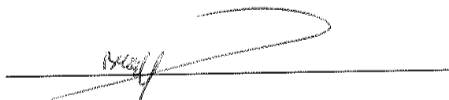
-A todos quienes fueron mis profesores de postgrado, por ser mis guías, por su tiempo, consejos y enseñanzas, por dar lo mejor de cada uno para mi formación.

-Al Dr. Jadd Abbas, por sus enseñanzas, apoyo, tutoría y supervisión para la realización de este trabajo.

Y por supuesto:


-A mi prima Gaby. Dios unió nuestros caminos para hacernos no sólo familiares, sino compañeras, amigas, por ser mi bastón cada día de residencia. Por luchar juntas, aprender juntas, llorar juntas, festejar cada logro juntas. Gracias eternas por ser incondicional. Te quiero.

Este trabajo de graduación fue aceptado por el Posgrado de Neumología como requisito para optar por el título de Especialista en Neumología.



Dra. Betty Rocha Contreras.

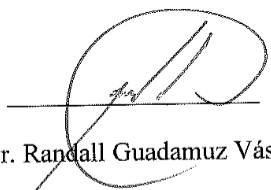
Coordinadora Nacional Programa de Posgrado en Neumología



Dra. Melissa Masís Quesada.

Directora de Tesis

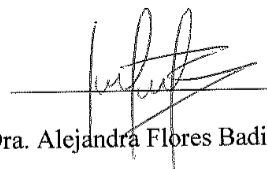
Especialista en Medicina Interna y Neumología



Dr. Randall Guadamuz Vásquez

Especialista en Medicina Interna y Neumología

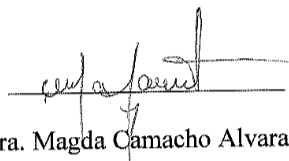
Lector



Dra. Alejandra Flores Badilla

Especialista en Neumología

Lectora



Dra. Magda Camacho Alvarado

Sustentante

Tabla de contenidos

Contenido	Página
Portada.....	I
Dedicatoria.....	II
Agradecimientos.....	III
Hoja de aprobación.....	IV
Tabla de contenidos.....	V
Resumen	VI
Lista de Cuadros	VIII
Lista de Figuras.....	X
Lista de Abreviaturas.....	XII
Introducción.....	1
Marco Teórico	3
Objetivos.....	20
Materiales y Métodos.....	21
Fuente y Recopilación datos.....	22
Resultados.....	23
Discusión.....	37
Conclusiones.....	42
Anexos.....	44
Anexo 1: Hoja Recolección de datos	44
Anexo 2: Carta autorización Comité Ético Científico HCG.....	45
Anexo 3: Revisión firmada de Filología.....	47
Anexo 4: Autorización para la digitalización de TFG.....	48
Bibliografía.....	49

Resumen

El derrame pleural se define como la acumulación de líquido en el espacio pleural debido a un proceso patológico que provoca desequilibrio en la tasa de formación y/o absorción del líquido pleural. Múltiples entidades clínicas provocan estas alteraciones y las neoplasias son un grupo frecuente que lo origina. El líquido pleural maligno es rico en productos derivados de los tumores con potencial utilidad diagnóstica y terapéutica con mínimo riesgo para el paciente.

En la actualidad, donde priva la medicina de precisión, es posible identificar malignidad mediante los hallazgos citomorfológicos en líquido pleural con el aporte de estudios auxiliares, como marcadores de inmunocitoquímica e incluso, estudios moleculares.

En Costa Rica, aunque se efectúan estudios citológicos, inmunocitoquímicos y moleculares en el líquido pleural, no se cuenta con descripciones locales que demuestren la utilidad de analizar dichas muestras para tipificación de estirpe de la neoplasia. El objetivo de este estudio es describir las características de los líquidos pleurales analizados en el Hospital Calderón Guardia en el período comprendido entre enero 2019 y agosto 2021 y con base en dichos hallazgos proponer recomendaciones de manejo de dichas muestras con el fin de optimizar su aprovechamiento y utilización y así, incrementar la rentabilidad diagnóstica de los mismos. **Materiales y Métodos:** Estudio observacional, retrospectivo, descriptivo de 155 muestras de líquido pleural de pacientes con sospecha clínica o radiológica de malignidad, obtenidas en el Servicio de Neumología del HCG y procesadas en el Servicio de Patología del mismo centro. **Resultados:** Se analizaron 155 reportes de líquidos pleurales, de los cuales se obtuvieron 55 muestras con diagnóstico de malignidad, con una sensibilidad del 57%. En 50 casos se pudo realizar ICQ y se evidencia que la neoplasia pulmonar fue la más frecuente seguida de la hematológica. Se lograron realizar 37 bloques celulares, de los cuales 15 fueron empleados para estudios moleculares principalmente en los adenocarcinomas de pulmón. **Conclusiones:** El estudio demuestra que optimizando el manejo de las muestras de líquido pleural (volumen enviado, almacenamiento y técnicas patológicas) se puede realizar diagnóstico no sólo citomorfológico, sino que se pueden implementar técnicas de inmunocitoquímica. La obtención de bloque celular ayuda a recopilar más material especialmente para estudios moleculares.

Executive Summary

Background: Pleural effusion is defined as the accumulation of fluid in the pleural space, due to a pathological process that causes an imbalance in the rate of formation and/or absorption of pleural fluid. Multiple clinical entities cause these alterations, and neoplasms are a frequent group that originates them. Malignant pleural fluid is rich in tumor-derived products with potential diagnostic and therapeutic utility with minimal risk to the patient.

Currently, where precision medicine is in development, it is possible to identify malignancy through cytomorphological findings in pleural fluid with the contribution of auxiliary studies, such as immunocytochemical markers and even molecular studies.

In Costa Rica, although cytological, immunocytochemical and molecular studies are carried out on the pleural fluid, there are no local descriptions that demonstrate the usefulness of analyzing these samples for typing the type of neoplasia. The objective of this study is to describe the characteristics of the pleural fluids analyzed at the Calderón Guardia Hospital in the period between January 2019 and August 2021 and, based on these findings, propose recommendations for the handling of the samples in order to optimize their use and thus, increase their diagnostic yield. **Materials and Methods:** Observational, retrospective, descriptive study of 155 samples of pleural fluid from patients with clinical or radiological suspicion of malignancy, obtained in the Respiratory Department of the HCG and processed in the Pathology Department of the same center. **Results:** 155 reports of pleural fluids were analyzed, from which 55 samples obtained a diagnosis of malignancy, with a sensitivity of 57%. ICQ (immunocytochemistry) was performed in 50 cases, the most frequent finding was pulmonary neoplasia; followed by hematological malignancy.

Thirty seven (37) cell blocks were obtained, from which 15 were used for molecular studies, mainly in lung adenocarcinomas. **Conclusions:** The study shows that by optimizing the handling of pleural fluid samples (volume sent, storage, and pathological techniques), not only cytomorphological diagnosis can be made, but also immunocytochemical techniques can be implemented. Obtaining cell block helps to obtain more material specially for molecular studies.

Lista de cuadros

Cuadro #1. Características demográficas y clínicas de los pacientes a los que se estudió la muestra de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021.

Cuadro #2. Distribución de la edad y del volumen de líquido de los pacientes a los que se les estudió la muestra de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021

Cuadro # 3. Características de las neoplasias de pulmón obtenidas a partir de las muestras de líquido pleural, tomadas en el Servicio de Neumología del HCG, entre 01 enero del 2019 y el 31 de agosto 2021

Cuadro #4. Distribución de los resultados de los estudios moleculares realizados a las muestras de líquido pleural en búsqueda de neoplasias de los pacientes con cáncer de pulmón, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021.

Cuadro #5. Características demográficas y clínicas de los pacientes a los que se les estudió la muestra de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021., según presencia de malignidad.

Cuadro #6. Distribución del volumen de líquido tomado a los pacientes en los que se estudió la muestra de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021.

Cuadro #7. Evaluación diagnóstica de la citología para el diagnóstico de neoplasias de las muestras de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, tomadas en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021

Cuadro #8. Distribución de los resultados de la ICQ realizadas a las muestras de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021

Lista de figuras

Figura #1 Posibles componentes extraídos del LPL para su estudio (8).

Tabla 1 Incidencia más frecuente relacionada según localización del tumor primario.

Gráfico #1. Distribución de los pacientes en los que se estudió la muestra de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021, según grupo de edad y presencia de malignidad.

Gráfico #2. Distribución de los pacientes en los que se estudió la muestra de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021, según presencia de malignidad

Gráfico #3. Distribución de los pacientes en los que se estudió la muestra de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021, según tipo de neoplasia detectada.

Gráfico #4. Distribución de los pacientes en los que se estudió la muestra de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021, según tipo de neoplasia y género.

Gráfico #5: Distribución de los resultados obtenidos a partir de las pruebas de inmunocitoquímica realizadas a las muestras de líquido pleural en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero 2019 y el 31 agosto del 2021.

Gráfico #6: Distribución y resultado obtenido a partir de los bloques celulares extraídos del centrifugado del líquido pleural en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero 2019 y el 31 agosto del 2021

Gráfica # 7 Manejo de la muestra de LPL para análisis molecular

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALK: Linfoma quinasa anaplásico

ARN: Ácido ribonucleico

CA: Cáncer

CRC: Cáncer colorrectal

DPM: Derrame Pleural Maligno

FISH: Hibridización in situ

LPL: Líquido pleural

EGFR: Factor de crecimiento epidérmico

ICQ: Inmunocitoquímica

MET: Factor de transición de mesenquimal a epitelial

NGS: Secuenciación de nueva generación (next generation sequencing)

NSCLC: Carcinoma pulmonar de células no pequeñas

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

PD- L1: ligando de la proteína 1 de muerte celular programada

SCLC: Carcinoma pulmonar de células pequeñas

INTRODUCCIÓN

El derrame pleural se define como el acúmulo anormal de líquido en la cavidad pleural. Este acúmulo se produce cuando los mecanismos fisiológicos que regulan la producción y reabsorción se alteran, ya sea por aumento en la producción o alteraciones en el drenaje del mismo. Estas disrupciones pueden ser provocadas por diversas patologías entre las que con frecuencia se identifican las neoplasias (3,6). Los tumores que principalmente generan esta complicación son los de origen primario pulmonar o pleural, pero también se pueden encontrar derrames pleurales malignos producto de metástasis de lesiones tumorales localizadas en otras regiones como: mama, tubo digestivo y neoplasias hematológicas entre otras(3).

En el caso de derrame pleural maligno, es de especial interés su análisis y aprovechamiento ya que por medio de éste es posible obtener diagnóstico y estadiaje de enfermedades malignas (en caso de tumores no primarios de pleura), logrando omitir en algunas circunstancias estudios de mayor complejidad e invasión a los pacientes y que conllevan más morbi-mortalidad.

En Costa Rica, aunque se efectúan estudios citológicos, inmunocitoquímicos y moleculares en el líquido pleural, no se cuenta con descripciones locales que demuestren la utilidad de analizar dichas muestras para tipificación de estirpe de la neoplasia.

El objetivo de este estudio es describir las características de los líquidos pleurales analizados en el Hospital Calderón Guardia en el período comprendido entre enero 2019 y agosto 2021 y con base en dichos hallazgos proponer recomendaciones de manejo de las muestras de líquidos pleurales con el fin de optimizar su aprovechamiento y utilización en estudios patológicos y moleculares y así incrementar la rentabilidad diagnóstica de los mismos.

El análisis minucioso de este líquido mediante diversos estudios, puede aportar diagnóstico, pronóstico e incluso guiar el tratamiento que se ofrece al paciente en la era de medicina de precisión que vivimos actualmente.

MARCO TEÓRICO

1. ANATOMÍA PLEURAL

La pleura es una membrana serosa de origen mesodérmico constituida por dos capas, la pleura visceral y la pleura parietal. Ambas capas pleurales se unen en el hilio pulmonar, en el cual se localiza el ligamento pulmonar, formado por la deflexión de las hojas pleurales hacia el diafragma. La pleura visceral recubre la superficie del pulmón y la pleura parietal la superficie interna de la pared torácica, la cara lateral del mediastino y la superior del diafragma, dividiéndose por tanto en pleura parietal costal, mediastinal y diafragmática (1,2). Entre ambas pleuras hay un espacio cerrado denominado espacio o cavidad pleural. En condiciones normales en este espacio existe una pequeña cantidad de líquido pleural (LP) (aproximadamente menos de 10 ml en cada hemitórax) que lubrica y mantiene independientes ambas membranas pleurales permitiendo que se deslicen una sobre la otra durante los movimientos respiratorios (1,2).

Desde el punto de vista histológico, la pleura es una membrana delgada en la que se diferencian cuatro láminas o capas: el mesotelio, una delgada capa de tejido conectivo submesotelial; una capa de tejido rica en elastina; una tercer capa de tejido conectivo rico en arterias, venas, nervios y vasos linfáticos y una lámina profunda fibroelástica adyacente al parénquima pulmonar, pared torácica, diafragma y mediastino (1,2).

Las dos capas pleurales reciben irrigación arterial de la circulación sistémica. La pleura parietal costal recibe irrigación de las arterias intercostales, la pleura mediastínica de la arteria pericardiofrénica principalmente y la pleura parietal diafragmática de las arterias frénica superior y musculofrénica. La pleura visceral está irrigada por la circulación bronquial. En cuanto al drenaje venoso, la pleura parietal drena en las venas bronquiales, mientras que la pleura visceral lo hace en las venas pulmonares (1).

Existen diferencias en el drenaje linfático en ambas superficies pleurales. El sistema linfático de la pleura parietal es la vía de drenaje más importante de líquido y células del espacio pleural, especialmente en las partes más declives. En dicha zona existen numerosos orificios de 8-10 μm , los estomas, que comunican la cavidad pleural con unos espacios lagunares de donde parten los vasos linfáticos. El drenaje linfático de la pleura parietal se produce a través de diferentes ganglios: los de las zonas costal y diafragmática drenan a los ganglios paraesternales y los de la porción mediastínica lo hacen en los ganglios traqueobronquiales. La pleura visceral carece de estomas y sus vasos linfáticos no conectan con el espacio pleural. Estos vasos penetran en el parénquima pulmonar existiendo una conexión directa con el sistema linfático pulmonar, de forma que la linfa fluye hacia la parte medial del pulmón para desembocar en los ganglios linfáticos hiliares (1,2).

2. FORMACIÓN Y REABSORCIÓN DEL LÍQUIDO PLEURAL

En condiciones fisiológicas en el espacio pleural existe una pequeña cantidad de LP entre ambas pleuras, que representa un ultrafiltrado del plasma resultado del equilibrio de la filtración y la reabsorción pleural (1). Hay un equilibrio dinámico que se mantiene gracias al balance de presiones hidrostática y coloidosmótica entre los capilares viscerales y parietales, y a la integridad de la serosa y al drenaje linfático. Actualmente se acepta que el LP 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 linfáticos de la pleura parietal que drenan al sistema venoso sistémico (2). El volumen exacto del LP es desconocido, pero se acepta que es aproximadamente entre 0,1-0,3 ml/kg en cada hemitórax. (1,4). Dicha producción se mantiene en balance mediante su reabsorción, la cual es treinta veces mayor que su producción normal (1,2).

3. MECANISMOS DE PRODUCCIÓN DEL DERRAME PLEURAL

La acumulación patológica de líquido en el espacio pleural se denomina derrame pleural (DP). Las causas del DP son múltiples y el mecanismo de producción varía entre unas y otras. En función de este mecanismo, los DP pueden clasificarse en dos grandes grupos: trasudados y exudados. Un trasudado ocurre como consecuencia de una alteración de las presiones hidrostática y oncótica que regulan el paso de líquido a través de ese espacio. Indica generalmente que las membranas pleurales no están afectadas. Sin embargo, un exudado se produce cuando las superficies pleurales o la permeabilidad local capilar están alteradas (1,2). Las enfermedades que producen un DP con criterios de exudado causan cambios histopatológicos en las membranas pleurales (1-2). Para diferenciar ambos tipos de derrames se utilizan los criterios de Light,(1) basados en las características bioquímicas del LP, concretamente en la concentración de las proteínas y de la láctico deshidrogenasa (LDH) (1). Cuando la tasa de formación de líquido supera a la de absorción se produce una acumulación del mismo en el espacio pleural (2).

En resumen, los mecanismos patogénicos por los que se origina el DP son: (2)

1. Producción excesiva de líquido cuando existe:
 - a. Aumento de la presión hidrostática sistémica (por ejemplo en la insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) o en la hipertensión portal).
 - b. Descenso de la presión oncótica en la microcirculación (por ejemplo en la hipoproteinemia).
 - c. Aumento de la permeabilidad en la microcirculación pleural [por ejemplo en las infecciones, neoplasias o enfermedades colágeno-vasculares como la artritis reumatoide (AR) o el lupus eritematoso sistémico (LES)].
2. Reabsorción de líquido disminuida cuando existe:
 - a. Obstrucción del drenaje linfático (por ejemplo en algunas neoplasias)
 - b. Disminución de la presión negativa en el espacio pleural (por ejemplo en la obstrucción bronquial o atelectasia).

3. Movimiento de fluido desde el peritoneo a través de los vasos linfáticos diafragmáticos o de pequeños defectos diafragmáticos (por ejemplo en los DP secundarios a ascitis, obstrucción urinaria, síndrome de Meiggs o procesos pancreáticos).
 - a. Lesiones de estructuras vasculares, acumulándose en el espacio pleural sangre (por rotura de vasos sanguíneos) o linfa (por rotura del conducto torácico).

La acumulación de líquido en cavidad pleural ocurre cuando la capacidad de absorción es sobrepasada por aumento en la producción o cuando la capacidad de absorción se ve comprometida por bloqueo en los vasos linfáticos. La obstrucción de los estomas linfáticos, que se ubican exclusivamente en pleura parietal y drenan a ganglios linfáticos del mediastino, explica el porqué esta zona es frecuentemente afectada por diversas estirpes tumorales (2).

Las malignidades son una de las causas frecuentemente encontradas como etiología de un derrame pleural, lo cual se produce por diversas causas como irritación mesotelial con irritación local que se provoca por la invasión tumoral y que resulta en aumento de la permeabilidad capilar. Otro potencial mecanismo es el bloqueo del eflujo del líquido seroso a través de los vasos linfáticos por obstrucción de los estomas o por reemplazo de los ganglios linfáticos por neoplasias, o mediante la obstrucción del ducto torácico, como ocurre en los linfomas que puede resultar en un quilotórax (3).

La obstrucción de los vasos linfáticos por malignidad puede producir depósito de linfa y células tumorales en el espacio seroso, por lo que este es recurso útil para incorporar al abordaje diagnóstico. Sin embargo, este comportamiento es heterogéneo y varía según el comportamiento de distintas estirpes histológicas siendo por ejemplo, que en el carcinoma mínimamente invasor, el mecanismo más frecuente es la diseminación hematógica a la pleura parietal. La ruta transcelómica es la más frecuente que se observa en carcinoma de

ovario donde se involucra infiltración celular al peritoneo y por ende, tránsito de células tumorales y colonización por depósito de micrometástasis en espacios serosos (3).

El líquido pleural producto de causas neoplásicas puede o no contener células tumorales, sin embargo la ausencia de células tumorales en derrames pleurales malignos puede existir aun en neoplasias que si involucran la membrana serosa causadas por irritación u obstrucción de los vasos linfáticos, pero no necesariamente descaman células, como es el caso de los sarcomas, en donde las células están embebidas en la matriz y algunos carcinomas, posiblemente relacionados a una reacción desmoplásica, donde los depósitos metastásicos están cubiertos por linaje mesotelial y no se comunica al espacio seroso. Por otro lado, también podría relacionarse con el tiempo de supervivencia celular una vez las células exfoliadas al espacio seroso. Otros tumores provocan líquidos ricos en proteínas y forman agregados celulares tipo “*cannonballs*”, las cuales se presentan por ejemplo en neoplasias de mama. Así mismo, existen otros tumores donde las células no logran sobrevivir por tiempos prolongados, lo que reduce la capacidad de detección en la citología celular (3).

4. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS Y CLÍNICOS DEL DERRAME PLEURAL MALIGNO

Se diagnostican más de 175,000 casos de derrame pleural maligno (DPM) en Estados Unidos cada año, y al menos 50.000 en el Reino Unido, donde de ellos el 75% de los casos son consecuencia de diseminación metastásica de cáncer de pulmón o de mama (3) Por otro lado, alrededor del 15% de los pacientes con cáncer de pulmón manifiestan su enfermedad mediante el derrame pleural (3).

En Costa Rica, según el Instituto Nacional de Estadística y Censos al 4 de febrero de 2021, se reportaron 24 292 muertes por cáncer; de ellos 2910 fueron hombres y 2591 mujeres, ocupando así la segunda causa más frecuente de muerte en nuestra nación. Entre estos, el cáncer de pulmón ocupa el tercer lugar tanto en hombre como en mujeres (4).

El derrame pleural reduce el espacio torácico y los volúmenes pulmonares y aumenta la cavidad torácica conforme desciende el hemidiafragma ipsilateral, provocando así un defecto

ventilatorio de tipo restrictivo. Los pacientes con cáncer de pulmón y derrame pleural pueden presentar síntomas desde leves a moderados, sólo el 23% se describen como asintomáticos al momento del diagnóstico (3).

Los síntomas que se describen con más frecuencia son dolor de tipo pleurítico, indicando así la inflamación de la membrana pleural parietal, este dolor puede irradiarse al tercio superior del abdomen o incluso hacia el hombro ipsilateral debido a la afectación de nervios intercostales o del nervio frénico, respectivamente. Otro síntoma encontrado es la tos no productiva, presente en aproximadamente el 50% de los pacientes y cuya génesis no está completamente determinada, pero se plantea también ser secundaria a inflamación pleural, compresión pulmonar o de la pared bronquial. La disnea, descrita en el 70% de los pacientes con derrame pleural masivo, puede estar en relación con la disminución de la “*compliance*” o disminución en los volúmenes pulmonares en relación con la magnitud del derrame pleural, producto de disfunción diafragmática o cuando existe inversión diafragmática, donde la disnea es desproporcional al tamaño del DPL (3). En el derrame pleural masivo, los síntomas más frecuentes son consecuencia de compromiso funcional proporcional a la magnitud del líquido encontrado. La literatura describe que después de realizar una toracocentesis evacuativa, la capacidad vital documentada mediante prueba espirométrica aumenta de 390 a +/- 410 ml (3). Otros síntomas sistémicos descritos y asociados al desarrollo de una neoplasia, son pérdida de peso, debilidad, hemoptisis en aproximadamente 9% de los pacientes, fiebre y disfagia, entre otras (3).

5. UTILIDAD DEL LÍQUIDO PLEURAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE CÁNCER

Es importante destacar que todo derrame seroso contempla un proceso patológico, o dicho de otra manera, no existe derrame seroso que implique una condición de normalidad por sí mismo. Por tanto, su análisis y aprovechamiento con fines de obtener un diagnóstico etiológico es crucial. El primer paso al evaluar si una muestra es adecuada, es el análisis del tipo de células presentes en ella, si hay muchas o pocas poblaciones celulares, si estas están dispersas de manera individual o acomodadas en grupos o grandes formaciones celulares. El

siguiente paso es valorar si las células encontradas son las esperables en un líquido seroso (células mesoteliales, inflamatorias o histiocitos) o poblaciones anormales y es en este punto, donde el especialista en morfofocitología decide si existe necesidad de emplear otros estudios auxiliares con el fin de poder confirmar el origen celular (2).

Recomendaciones de expertos refieren que material con cantidad menor a 50 mililitros de LP, puede no ser óptima para excluir malignidad (2). No existe información de la cantidad mínima de células mesoteliales necesaria para determinar que la muestra sea adecuada. En los casos con escasa celularidad donde exista sospecha de malignidad, debe incluirse un comentario con el fin de aclarar la naturaleza del espécimen y la posibilidad de que exista baja sensibilidad. Otro factor influyente en que la muestra sea o no apropiada incluye no sólo la cantidad de células o el volumen de la muestra, sino también la preservación de la muestra. Este factor es de primordial importancia ya que un mal almacenamiento y preservación de las células puede comprometer no sólo la morfología sino también provocar degeneración celular y con ello provocar diagnósticos errados. Otras consideraciones que deben tenerse presente recaen en evitar contaminantes como talcos, células escamosas de la piel, sangrado y hemólisis de la muestra (2).

De acuerdo a las últimas guías de ASCO (Febrero, 2020), es recomendable realizar pruebas con múltiples biomarcadores, éstas serán aplicadas con fin de dirigir la terapia a emplear. El Análisis de Nueva Secuenciación es una técnica capaz de detectar múltiples aberraciones genéticas y es posible aplicarlo en muestras de líquido seroso. Gran cantidad de la literatura publicada, menciona acerca de la aplicación de diversos estudios en pacientes con NSCLC sin embargo, la aplicación de recientes métodos como la prueba de nueva secuenciación aplicada al líquido pleural puede detectar orígenes celulares de mama, colorectal, ovario, gástrico, cáncer de células pequeñas o incluso melanoma (11).

De manera similar al plasma, las muestras de líquido pleural permiten la realización de estudios moleculares, con el objetivo de identificar aberraciones que propicien resistencias a las diversas terapias diana, e incluso, aloja la posibilidad de dar seguimiento cercano durante

el curso de la terapia instaurada. Otra ventaja de este tipo de muestra, es que no se obstaculiza con problemas relacionados con la fijación con formalina (excepto el bloque celular) (2).

6. DERRAME PLEURAL PARANEOPLÁSICO Y DERRAME PLEURAL MALIGNO: ENTIDADES DISTINTAS DEL MISMO ESPECTRO

El derrame pleural paraneoplásico se determina en pacientes con cáncer de pulmón en quienes su neoplasia ha sido previamente diagnosticada y en quienes no se han detectado células malignas mediante estudios de citología o histopatológicos. Por lo que este tipo de líquido pleural no se considera un signo de infiltración pleural, es por ende una consecuencia de afectación local o sistémica del tumor. Por ejemplo, en casos que presentan obstrucción bronquial tumoral y se genera atelectasia correspondiente del segmento afectado, lo que provocará expansión compensatoria del hemitórax contralateral, produciendo menor presión intrapleural. Esta menor presión intrapleural es un factor adicional para que se genere mayor acúmulo de líquido en el espacio pleural (3).

La relación entre cáncer de pulmón y derrame pleural paraneoplásico se presenta en aproximadamente el 5% de los pacientes y se observa en casi cualquier estirpe histológica, la literatura lo describe en el 4,5% de los pacientes con carcinoma escamoso, 6,2% de los adenocarcinomas y hasta 6.5% de los SCLC, y de ellos el 67% presentan derrame pleural moderado – masivo. Macroscópicamente se describe que el 60% son líquidos serosos y el 21.3% presentan características hemorrágicas (3).

En pacientes de edad avanzada (mayores de 60 años), el derrame pleural maligno es una causa frecuente de derrame exudativo y constituye una vía de manifestación observada en el 55% de los pacientes en estudios retrospectivos (3). Histopatológica y citológicamente, un líquido pleural es maligno hasta que se confirme la presencia de células malignas (2,3). Este representa una enfermedad maligna en estadios avanzados (3). El 50% de los casos de derrame pleural maligno en hombres, se debe a cáncer de pulmón de diversas estirpes histológicas, aunque si se resguarda una mayor incidencia de hasta 31% de pacientes portadores de adenocarcinoma de pulmón que desarrollan derrame pleural (3). En otras

estirpes histológicas, por ejemplo en el carcinoma escamoso, de DPM se describe en el 8,6% de los casos, que equivale aproximadamente al 7 – 10% de los pacientes con carcinoma de células no pequeñas (3).

Las siguientes causas neoplásicas más relacionadas a DPM ocurren en los pacientes con linfomas o leucemia, donde se encuentran descritos en el 20% de los casos, luego el DPM se describe relacionado al 7% de los casos de neoplasia gastrointestinal, 6% de neoplasias genitourinarias y hasta un 11% de neoplasias de origen desconocido.

En personas del género femenino se describe como principal etiología mitótica el cáncer de mama, el cual se presenta hasta en el 50% de los casos en el curso de la enfermedad. Luego se describe en el 20% de los casos relacionados con tracto genital, 15% de malignidad de origen pulmonar, 8% de linfomas o leucemias, 3% de melanoma y 9% de origen desconocido. (3)

En la **tabla 1** se presenta la incidencia más frecuente relacionada según localización del tumor primario. (3)

TABLA 1: Frecuencia de aparición de derrame pleural según sitio de origen primario

LOCALIZACIÓN TUMORAL	INCIDENCIA
MAMA	26- 49%
PULMÓN	10- 24%
LINFOMA	> 24%
LINFOMA NO HODGKIN	13- 24%
OVARIO.	6- 17%
ENFERMEDAD DE HODGKIN	> 13%

En siete series publicadas de DPM y analizadas con récord de hasta 500 pacientes, el análisis citológico muestra una rentabilidad diagnóstica que oscila de 66-76%, siendo incluso mayor que la biopsia de pleura a ciegas, que presenta un valor predictivo positivo de tan solo el 46%; y se sabe que en estas se encuentra un importante margen de falsos negativos. Así, se puede decir por tanto que el análisis citológico de líquido pleural, presenta mayor

especificidad comparada con la biopsia de pleura cerrada. La combinación de ambas alcanza según la literatura, una rentabilidad diagnóstica del 73%, semejante a la citología del LPL (3)

7. SOBRE LAS CAUSAS METASTÁSICAS MÁS FRECUENTES EN EL ESPACIO PLEURAL

El derrame pleural maligno se caracteriza por la presencia de células malignas. En promedio se presenta en el 15% de los pacientes con patología maligna y su hallazgo generalmente indica un pronóstico comprometido. Dos terceras partes de los pacientes con malignidad presentan derrame pleural como manifestación inicial de su enfermedad o al menos una en el curso de la misma y de ellos el 75% se origina de cáncer de pulmón, mama y linfoma, y hay un 5 – 6% de los pacientes con origen desconocido. (5,6).

El cáncer de pulmón es la neoplasia más frecuente a nivel mundial, correspondió al 11.6% (2.1 millones) de nuevos casos detectados en el 2018, y fue responsable del 18,4% de las muertes por cáncer. Tiende a ocurrir con mayor frecuencia en hombres, pero su incidencia en mujeres no es despreciable (5). El cáncer de pulmón se clasifica histopatológicamente en dos principales grupos: el carcinoma de células pequeñas (SCLC) y el carcinoma de células No pequeñas (NSCLC). Este último, el NSCLC, representa el 85% del total de tumores de pulmón que se detectan, y éste a su vez se subdivide en: adenocarcinoma (25 – 30%), carcinoma escamoso (40%), y carcinoma de células grandes (5-10%). (5). El derrame pleural maligno es detectado al inicio de la enfermedad en el 8- 15% de todos los pacientes con cáncer de pulmón, pero se presenta hasta en el 40- 50% en el curso de su enfermedad; suele presentarse en el 90% de los casos ipsilateral al sitio de origen tumoral y 10% bilateral o contralateral (5).

Respecto a otras neoplasias, la segunda causa más común a nivel mundial es el cáncer de mama, el cual a su vez es la primera neoplasia mayormente detectada en mujeres alrededor del mundo. Corresponde a 11,6% de todos los nuevos casos en el 2018, y es responsable del 6,6% de las muertes por cáncer y su incidencia sigue en aumento gracias a la implementación de mecanismos de prevención pública (5,6). La prevalencia de DPM asociado a neoplasia de

mama es del 2 al 11%, más relacionado al cáncer de tipo triple negativo. Su presencia se relaciona con un mal pronóstico y puede presentarse años después de su diagnóstico, incluso 2 a 3 años más tarde y ser consecuencia de diseminación metastásica al espacio pleural que ocurre a consecuencia de invasión de vasos linfáticos. Dentro de las características de las metástasis por neoplasia de mama, es que estas suelen presentar cambios moleculares o mutaciones, y es por ellos que el biomarcador ki – 67 es determinado como factor de mal pronóstico, este puede encontrarse en el 63% de los DPM (5,6).

En otras neoplasias, como el cáncer de ovario epitelial, la manifestación más frecuente relacionada a invasión peritoneal es el DPM, reportado en el 33 - 53% de los casos, producto de infiltración directa de células neoplásicas a pleura, vía diafragmática, llevando así una ruta pleuro-peritoneal o también vía diseminación hematógena. Puede encontrarse en el 15% de los casos de reciente diagnóstico, como presentación inicial, siendo una manifestación ipsilateral en el 77% de los casos o bilateral en el 23%. (5)

Los linfomas representan un grupo heterogéneo de cáncer en la sangre caracterizado por el crecimiento descontrolado de células del tejido linfático. Se clasifican en dos principales grupos: los Linfomas de Hodgkin (LH) y los Linfomas de No Hodgkin (LNH). En el 2018, se reportaron 509,590 casos nuevos de LNH (representa el 2,8% de todos los nuevos casos de cáncer en el mundo) y 79, 990 casos de LH (representa el 0,4 de todas las neoplasias) (5). El DPM asociado a Linfoma No Hodgkin, ocurre en el 16 – 20% de los casos, es frecuente encontrarlo unilateral, predominantemente izquierdo y más relacionado a linfoma de células gigantes B, en el 60% de los casos o el linfoma folicular en el 20% de los casos. El mecanismo fisiopatológico subyacente es mediante la infiltración directa de la pleura, por interacciones del tumor con el huésped u obstrucción de los vasos linfáticos pulmonares o mediastinales o puede verse en relación a quilotórax, producto de la obstrucción del ducto torácico (5). En el Linfoma de Hodgkin, el DPM se desarrolla como manifestación inicial de la enfermedad en el 10- 30% de los pacientes, pero el 60% de los pacientes lo presentan durante el curso de su enfermedad como consecuencia de progresión. El trabajo diagnóstico de linfoma es arduo, debido a la conformación paucicelular del líquido. La presencia de DPM, relacionado a

linfoma, se relaciona a pobre pronóstico, debido a que un tercio de estos son quimio resistentes (5).

8. DERRAME PLEURAL POR MALIGNIDAD PRIMARIA DE PLEURA

Las malignidades primarias detectadas en líquido pleural generalmente implican la existencia de mesotelioma u otras malignidades de origen mesenquimal o linfoproliferativo cuyo origen sea cavidades serosas (2). Mesotelioma es una proliferación maligna del mesodermo, derivado de células serosas que se alinean en la pleura, peritoneo, y en la túnica vaginalis. El mesotelioma, usualmente provoca exofiliación celular hacia cavidades serosas.(5). La incidencia de mesotelioma maligno se reporta en 2500 casos en USA y puede ser tan alto como 5000 en Europa Oeste anualmente. Se estima que en el año 2018 más de 30,000 pacientes fueron diagnosticados con mesotelioma globalmente, de los cuales 26,000 mueren a causa de esta misma enfermedad. En áreas endémicas como Turquía, donde la población de manera global se expone a dosis altas de asbesto, la tasa de incidencia está descrita en 20/100.000 personas/año (2). Se calcula que hay aproximadamente 3000 nuevos casos de mesotelioma en Estados Unidos cada año (5).

El mesotelioma maligno es subclasificado en epiteloide, sarcomatoide o bifásico (mixto) (2). Los de componente epiteloide tienden a exfoliar de manera abundante, mientras los de componente sarcomatoide rara vez lo hacen, es por esta razón que la gran mayoría de casos detectados mediante citología reflejan la variante epiteloide o variante bifásica (2). El derrame pleural maligno ocurre en el 54 – 90% de todos los casos de mesotelioma pleural maligno, este es biológicamente activo ya que “protege” a las células tumorales de la quimioterapia e induce crecimiento tumoral (5).

9. ANÁLISIS DEL LÍQUIDO PLEURAL MALIGNO

Expuesta ya la evidencia de la frecuente relación que existe entre algunos tumores malignos y el desarrollo de un derrame pleural es que cobra importancia realizar un apropiado y exhaustivo análisis del LPL, con el objetivo de obtener información histológica y molecular

con un mínimo de molestia y riesgo para el paciente. La sensibilidad y especificidad de la citología para detectar malignidad oscila entre un 40 – 80% y 89 al 98% respectivamente. El uso de técnicas auxiliares como realizar un bloque celular para estudios inmunohistoquímicos y análisis molecular ha sido frecuentemente empleada en aras de evitar confusiones y aumentar la sensibilidad y especificidad a un 94 y 100% respectivamente (7). El estudio del líquido pleural gana más importancia en su obtención por la utilidad de buscar y obtener biomarcadores que aporten diagnóstico ágil y eficaz. En la práctica clínica es crucial su aprovechamiento para el abordaje de neoplasias en estadios avanzados, de manera que sea el medio para obtener información para así guiar la terapéutica. En específico, es recomendable su estudio en NSCLC metastásico así como en otras neoplasias (mama, gastrointestinal, melanoma y otras). Si bien se requiere realizar una toracocentesis, como método para obtener muestra de líquido pleural, éste es un procedimiento mínimamente invasivo, seguro, con capacidad de poder repetirse (de ser necesario) y por ende, representa una prueba costo – efectiva mejor comparada con muestras de tejido obtenidas por biopsia a ciegas (5,3). Desde una perspectiva biológica el líquido pleural supone contener células tumorales provenientes del amplio genoma complejo que pueden coexistir en estos tumores. De acuerdo con algunas sociedades como el Colegio Americano de Patólogos (CAP), la Sociedad Internacional para Estudio del Cáncer (IASLC), la Asociación para Estudio Molecular de Patólogos, la Sociedad Clínica de Oncólogos (ASCO), se aprobó que pacientes con NSCLC y derrame pleural deben ser estudiados mediante pruebas moleculares de EGFR, ALK, ROS1, BRAF (oncogen viral homólogo Log B para sarcoma), que representan las mutaciones más frecuentes para uso de terapia específica con Inhibidores de Tyrosin Kinasa, así como regímenes de uso anti PD-L1 (2).

Los primeros intentos por identificar puntos de mutación del ADN tumoral en las células, datan de 1990, con el proyecto realizado por el Genoma Humano. En 1994 Vasioukhin *et al*, detectan puntos de mutación en el NRAS en la sangre de pacientes con leucemia y secuencias mutadas por KRAS en el plasma y sangre de pacientes con adenocarcinoma de páncreas. Sin embargo, fue hasta la década pasada que los investigadores inician estudios para considerar LPL como una fuente de detección de mutaciones en el ADN tumoral(8).

Hasta el año 2005, Huang *et al*, reportaron por primera vez la detección específica de la mutación EGFR en el exón 19, usando reacción en cadena de polimerasa (PCR) seguida de secuenciación de ADN en bloque celular (3). De manera similar, la literatura describe la capacidad de detectar mutaciones como EGFR, KRAS, ALK, RET, mediante secuenciación directa de ADN en productos previamente amplificados obtenidos tanto del supernadante, como del bloque celular en 722 pacientes con adenocarcinoma metastásico con citología previa positiva por cáncer (8). La secuenciación mediante reacción en cadena de polimerasa es útil para la identificación de mutaciones como EGFR en muestras de bloque celular de tumores primarios o metastásicos a pleura. Los autores describen que existe una discordancia considerable de hasta un 16,2 % entre la existencia de mutaciones en el tumor primario y la lesión metastásica pero que, en los casos donde existe esta discordancia, la respuesta a la terapia blanco correlaciona más en la lesión metastásica que en el tumor primario (8). La secuenciación de nueva generación (NGS) es otro método que puede ser usado para detectar mutaciones en el EGFR en tumores paucicelulares (considerados aquellos con menos del 10% de células tumorales). Esta tecnología permite realizar secuenciación masiva mediante mínima cantidad de ADN (11). El NGS puede emplearse para detectar mecanismo de resistencia farmacológica, como lo es la amplificación MET, que surge posterior a tratamiento con Icotinib(4). Este ha demostrado ser el método más exitoso en su capacidad de detectar múltiples alteraciones genéticas, siendo 3492x mayor que los otros métodos descritos, que se obtienen a partir de bloque celular del Lpl de pacientes con cáncer de pulmón (8).

La posibilidad de determinar diferentes productos derivados del tumor dentro del espacio pleural se vuelven claves y trascendentales para el abordaje diagnóstico de los pacientes con malignidad de fondo. Estos productos son numerosos y es posible encontrarlos mediante análisis detallado y presentan utilidad por la capacidad de mostrar biomarcadores propios del origen de cada caso (8).

En la Figura 1 que se incluye a continuación se muestran los posibles componentes extraídos del LPL para su estudio (8).

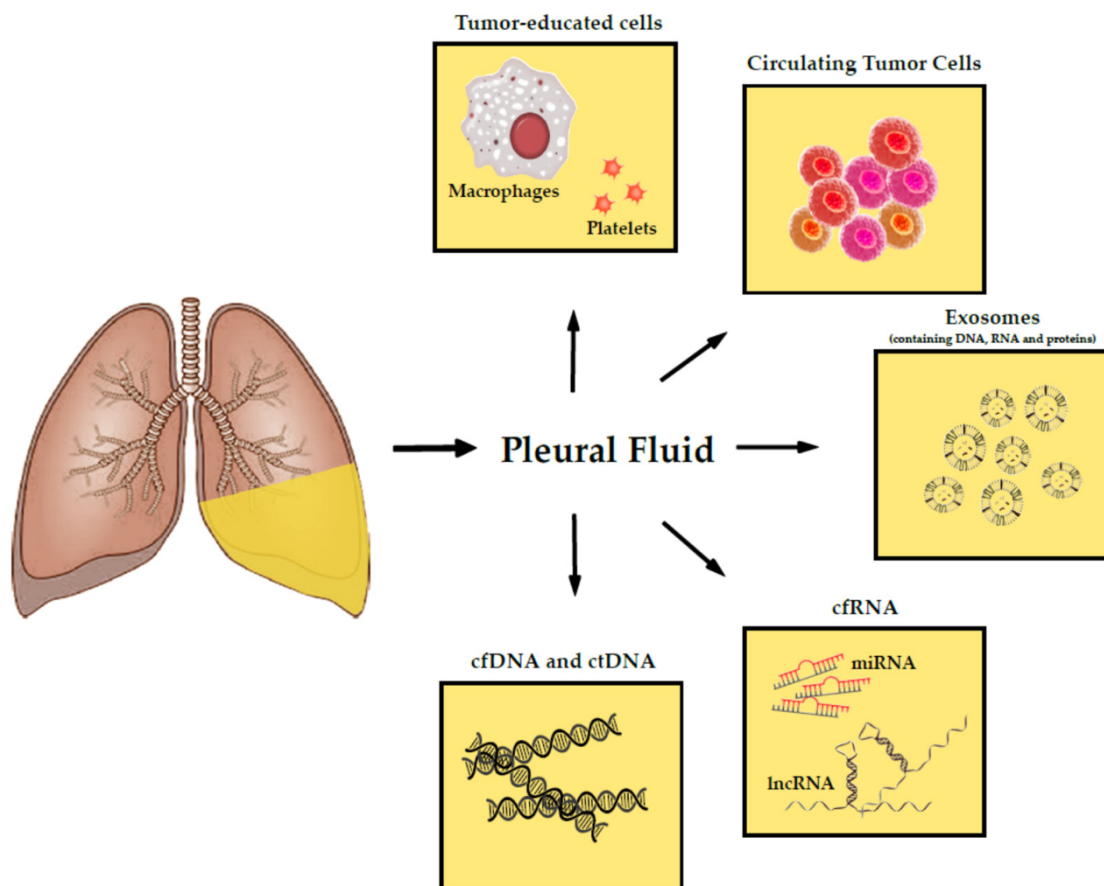


Fig. 1. Representación esquemática de los productos derivados de tumor en líquido pleural. Abreviaciones: ácido desoxiribonucleíco (DNA), ADN libre tumoral (cfDNA), ARN libre tumoral (cfRNA), ADN tumoral circulante (ctDNA), ácido ribonucleíco(RNA) micro-RNA (miRNA), RNA de cadena larga (lncRNA). *Tomado de Cancers: Diving into the Pleural Fluid: Liquid Biopsy for Metastatic Malignant Pleural Effusions* (8).

El líquido pleural obtenido es centrifugado y así se obtienen por separado dos principales compuestos, un supernadante y el bloque celular al fondo del mismo (9).

Este bloque celular o conglomerado celular, es usado en diversas alternativas, tanto para su análisis morfológico, así como tinciones dirigidas según sospecha, como lo es la inmunocitoquímica y gracias al avance de la medicina, hoy día permite aplicar a este líquido, técnicas como FISH, y otorgan capacidad de determinar aberrancias genéticas, como EGFR, ALK, NGS(9).

Respecto al supernadante, hasta la actualidad muchas veces descartado, los estudios recientes muestran una adecuada rentabilidad diagnóstica en análisis moleculares, incluso comparable

con lo obtenido del bloque celular; lo cual es una alternativa a considerar para emplear, sobretodo en el paciente frágil, donde este podría ser el único sitio de obtención de material diagnóstico viable (10).

La detección de células malignas en el LPL representa información de alto valor para el diagnóstico de malignidad y con ello se puede brindar una propuesta terapéutica como método de poca invasión y riesgo para el paciente. Esta capacidad de detección impacta en el diagnóstico y atribuye un estadio avanzado per se, ya que la detección de células malignas en líquido pleural denota enfermedad avanzada; el pronóstico y las opciones terapéuticas pueden tener base según estos resultados y proveer orientación en el manejo de este grupo de pacientes. Las herramientas auxiliares requeridas para la correcta confirmación etiológica, como lo son las distintas ICQ, o la citometría de flujo, confieren la capacidad para diferenciar entre distintas neoplasias y su origen (8). El uso de la ICQ, permite dirigir y clasificar los orígenes tumorales y su utilidad está bien descrita (2).

La inmunocitoquímica representa un método de estudio comúnmente conocido debido al valor adjunto que se extrae paralelo al análisis citomorfológico para confirmar la presencia de tumor y su clasificación según subtipos. Su principal beneficio recae en lograr demostrar de manera definitiva una malignidad, sobre todo cuando se trata de tumores poco diferenciados y su confirmación no se logra alcanzar solamente por medios morfológicos (2).

El análisis citogenético, ha sido empleado tanto para cariotipo como hibridización *in situ* (FISH) en una variedad de preparados; su uso es aplicado para diagnóstico, particularmente de mesotelioma, linfoma o sarcoma y otras neoplasias, como pulmón para la detección de alteraciones genéticas como *ALK* y *ROS 1*, los cuales son encontrados en carcinoma de células no pequeñas (7).

Respecto al uso de la citometría de flujo, ésta ha emergido como una prueba sensible y reproducible, de bajo costo y obtenida en corto tiempo, empleada particularmente para detección y clasificación de neoplasias hematolinfoides. Los líquidos ricos en linfocitos, muchas veces representan un desafío para el patólogo, ya que linfocitos reactivos en

ocasiones pueden confundirse como atípicos, sin embargo el empleo de estas técnicas ayudan a la detección correcta de enfermedad maligna. (7).

En resumen, entramos a la era de la medicina de precisión, donde obtener información diagnóstica que ofrezca manejo y pronóstico a expensas de análisis molecular y citopatológico ha sido puesta en práctica con fin de poder detectar alteraciones estructurales cromosómicas o mutaciones producto de la heterogeneidad tumoral. La importancia de analizar los líquidos serosos es creciente debido al desarrollo de nuevos medicamentos, particularmente en relación a malignidades de origen pulmonar, pero también se puede extrapolar esta utilidad a otras etiologías. Los principales métodos utilizados para detectar estas alteraciones son FISH; PCR (reacción en cadena de polimerasa) NGS (análisis ADN o ARN de nueva generación) pueden emplearse en material citológico. Sin embargo, para lograr obtener muestras apropiadas deben tenerse en cuenta factores pre analíticos y protocolos en aras de entregar muestras apropiadas y de alta calidad, útiles para su correspondiente análisis (2,11).

Objetivos

Objetivo General:

Analizar la utilidad del líquido pleural para el diagnóstico de neoplasia primaria y metastásicas pulmonares y extrapulmonares a pleura de personas usuarias del Servicio de Neumología del Hospital Calderón Guardia entre 01 enero 2019 y el 31 agosto 2021

Objetivos Específicos:

- Describir las características macroscópicas del líquido pleural de la población estudiada
- Describir las características de la citología, bloque celular e inmunocitoquímica del líquido pleural de la población estudiada.
- Identificar la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas (citología, bloque celular e inmunocitoquímica) en neoplasias primarias y metastásicas de pleura de la población estudiada.

Materiales y Métodos

El presente es un estudio observacional retrospectivo de tipo descriptivo desarrollado en el período de enero del 2019 hasta agosto del 2021, en pacientes con diagnóstico o sospecha de patología maligna primaria pulmonar o de otro origen a criterio médico en la clínica de pleura del servicio de Neumología del Hospital Calderón Guardia.

- **Selección de los individuos**

- √ Se estudiaron pacientes adultos desde los 18 años, con evidencia ultrasonográfica en tiempo real de derrame pleural y sospecha clínica de malignidad.

- **Criterios de inclusión**

- √ Individuos mayores de 18 años, de uno u otro género, sin distinción de etnia que presentaron derrame pleural de origen no infeccioso, que tuvieron sospecha de malignidad de novo o recaída de neoplasias previas y a quienes se les realizó análisis del líquido pleural
- √ Se analizan resultados de líquidos pleurales de tipo citología, bloque celular, inmunocitoquímica y moleculares tomados en el Servicio de Neumología del Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia y procesados en el Servicio de Patología del mismo hospital entre enero 2019 y agosto 2021.

- **Criterios de exclusión**

- √ Líquidos pleurales con evidencia de infección en resultados de citología y/o histológicos.

- **Fuentes y recopilación de los datos**

Los datos se obtuvieron del expediente electrónico de los pacientes a quienes según el registro del Servicio de Neumología se les tomó muestra de líquido pleural y se constata mediante resultado en EDUS de reporte emitido por parte de patología

Los datos fueron recopilados en un formulario estandarizado y los casos con evidencia de malignidad se completa hoja de recolección de datos. **Anexo 1**

- **Procesamiento y Análisis de datos**

Para el análisis de las variables del estudio se utilizó estadística descriptiva, medidas de tendencia central y de dispersión para las variables cuantitativas y distribuciones de frecuencia para las variables cualitativas. Para comparar las variables cuantitativas se utilizaron análisis de varianza de un factor y para las variables cualitativas se usaron pruebas de Chi cuadrado o Exactas de Fisher cuando el Chi cuadrado no fuera aplicable. Adicionalmente se estimó la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de las citologías para la detección de neoplasias. El nivel de significancia utilizado fue del 5%. El análisis se realizó en Microsoft Excel y Past versión 4,2.

- **Consideraciones éticas.**

- √ Dado que la información fue obtenida del expediente electrónico de los pacientes, no se solicitó consentimiento informado y se cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Calderón Guardia . (Anexo 2)

Las características demográficas de la población incluida en el presente estudio revelan que la mayoría de muestras de líquido pleural correspondían a pacientes de género femenino (55.5% contra 44.5% de género masculino) (ver cuadro #1). La distribución por grupo etario mostró que el 81.3% de los pacientes atendidos por derrame pleural fueron personas mayores de 50 años, lo que refleja que a partir de esta edad hay un creciente número de casos positivos por malignidad, tanto detectados mediante el LPL como en otros tejidos. (ver gráfico #1).

Se analizaron en total 155 reportes de líquido pleural de los cuales 55 casos (35.5%) fueron positivos por malignidad según los hallazgos citomorfológicos y/o ICQ. De estas muestras en 39 casos fue posible la obtención de bloque celular, en los que el 89% (n=33) fue positivo por malignidad. Hubo 6 casos de discordancia entre el resultado de la citología y el bloque celular.

De la totalidad de los casos, en 50 casos fue posible realizar inmunocitoquímica con lo que se logra confirmar el origen tumoral y en 4 casos descartar la presencia de malignidad. (ver cuadro #1).

Con respecto a las características macroscópicas de las muestras de los líquidos pleurales, se extrae que un 65% de éstas se describen amarillentas o rojizas; sin embargo existe un 26.5% de los cuales no se logró obtener las descripciones correspondientes, pues no existían anotaciones al respecto (ver cuadro #1).

Cuadro #1. Características demográficas y clínicas de los pacientes a los que se estudió la muestra de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021.

<i>Variable</i>	<i>Cantidad (n=155)</i>	<i>%</i>
Año		
2019	59	38.1%
2020	60	38.7%
2021	36	23.2%
Grupo de edad		
< 50 años	23	14.8%
50 a 69 años	61	39.4%
≥ 70 años	65	41.9%
Sin datos	6	3.9%
Sexo		
Masculino	69	44.5%
Femenino	86	55.5%
Aspecto LPL		
Líquido blanquecido	1	0.6%
Líquido purulento	1	0.6%
Líquido verde blanquecino	1	0.6%
Líquido café claro	2	1.3%
Líquido anaranjado	6	3.9%
Líquido rojizo	37	23.9%
Líquido amarillo	66	42.6%
Sin datos	41	26.5%
Malignidad		
Negativo	61	39.4%
Positivo no en LPL	39	25.2%
Positivo en LPL	55	35.5%
Diagnóstico		
Negativo	100	64.5%
Positivo	55	35.5%
Citología		
Negativo	100	64.5%
Positivo	55	35.5%
BC		
No	40	25.8%
Sí	39	25.2%
Sin datos	76	49.0%
IHQ		
No	35	22.6%
Sí	50	32.3%
Sin datos	70	45.2%

Gráfico #1. Distribución de los pacientes a los que se estudió la muestra de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021, según grupo de edad y presencia de malignidad.

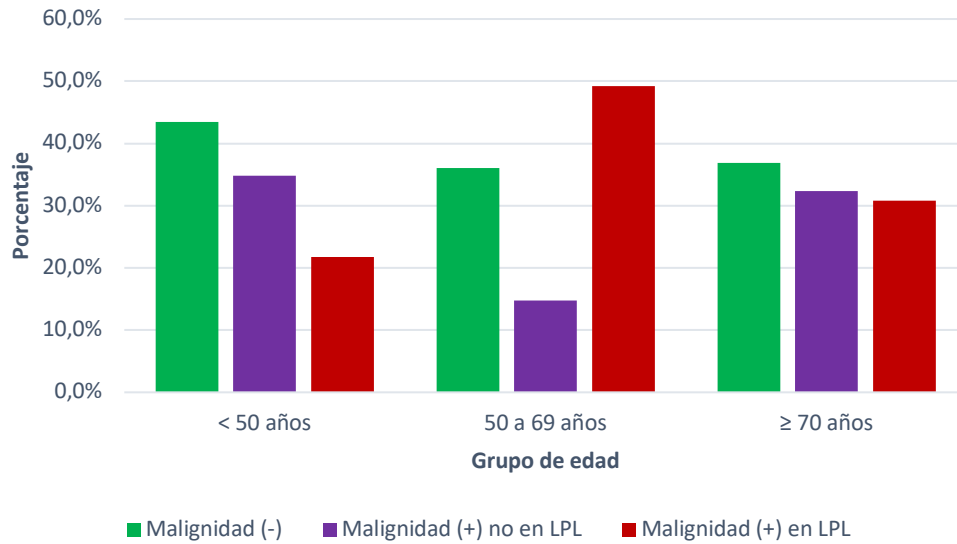
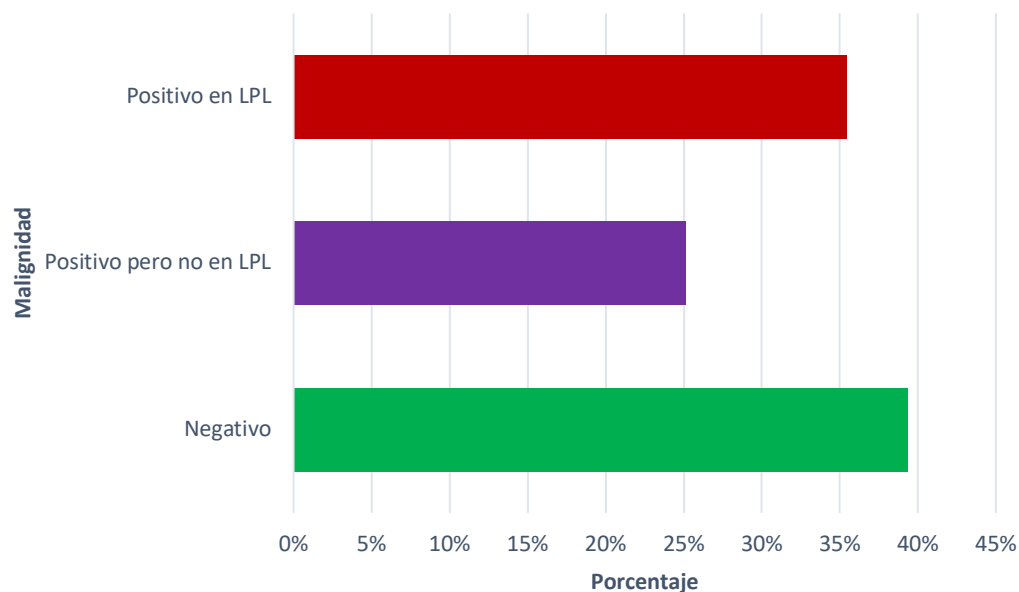


Gráfico #2. Distribución de los pacientes a los que se estudió la muestra de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021, según presencia de malignidad.



Del total de muestras analizadas, 39 % de los casos (n=61) fueron negativos por malignidad, en el 35% (n=55) se confirmó que correspondían a derrames malignos. Se identificaron 39 casos cuyo análisis de líquido pleural fue negativo y que requirieron otros estudios para obtener diagnóstico etiológico de su patología neoplásica.

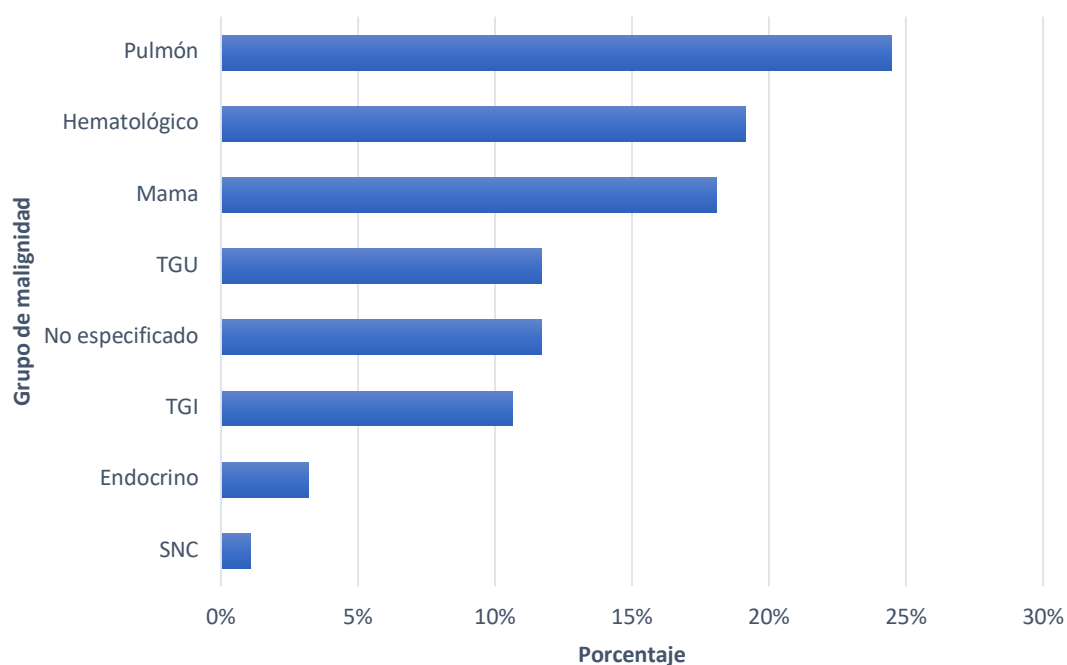
Cuadro #2. Distribución de la edad y del volumen (en cc) de líquido de los pacientes a los que se estudió la muestra de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021.

<i>Medida</i>	<i>Edad</i>	<i>Volumen</i>
Promedio	64.8	14.5
Mediana	67.0	14.0
Moda	59.0	18.0
Desv std	17.0	9.2
Mínimo	15.0	2.0
Máximo	95.0	70.0
Cantidad	149	121

El análisis de las edades de los pacientes en los cuales se les realizó LPL en el período estudiado, evidenció un promedio de edad de 64.8 años.

Respecto al volumen reportado se observa que el promedio de líquido analizado en el laboratorio de patología fue de 14.5 cc, con un mínimo de hasta 2 cc. Además de las 155 muestras obtenidas, en 34 casos no existía registro del volumen aportado. (ver cuadro #2).

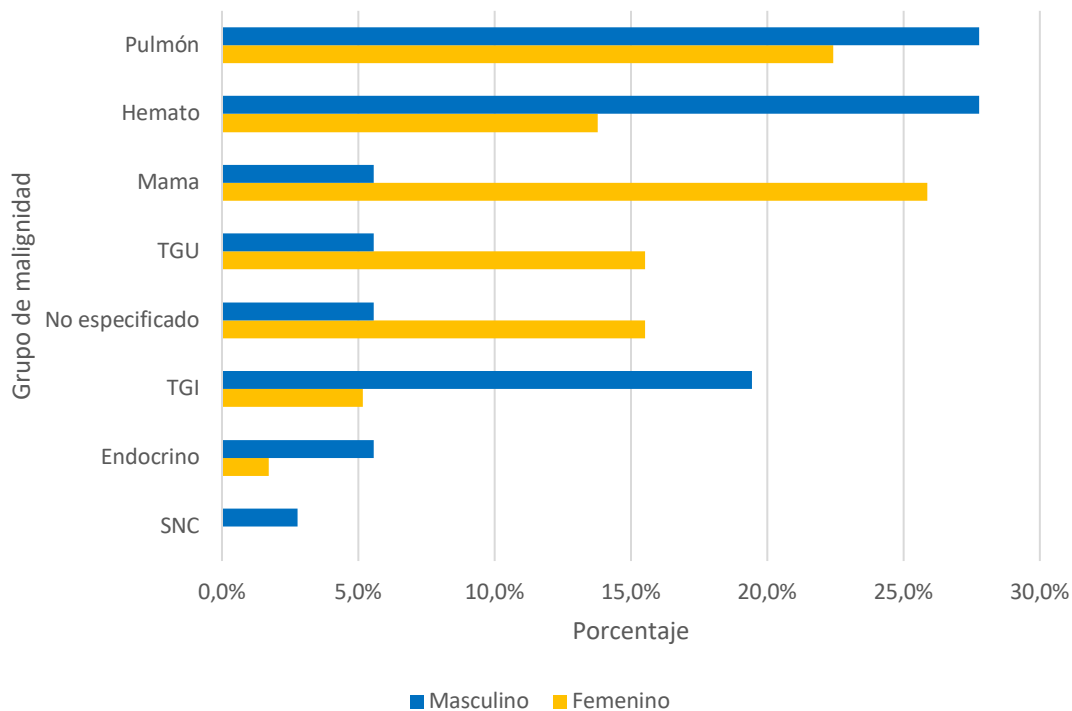
Gráfico #3. Distribución de los pacientes a los que se estudió la muestra de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021, según tipo de neoplasia detectada.



Del total de casos positivos por malignidad se evidencia que la neoplasia encontrada con mayor frecuencia fue la pulmonar en casi un 25% de la muestra, seguida de la de origen hematológico y mama casi en proporciones equivalentes. (19 y 18% respectivamente).

En orden decreciente, los siguientes grupos de malignidad detectada fueron los genitourinarios y tracto gastrointestinal, los cuales abarcan un 12 y 11% de la muestra respectivamente. Cabe mencionar que en un 12% de los casos positivos, se detectaron células malignas sin lograrse una diferenciación etiológica. (ver gráfico #2)

Gráfico #4. Distribución de los pacientes a los que se estudió la muestra de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021, según tipo de neoplasia y género.



La distribución por género evidencia que en el género masculino la neoplasia encontrada con mayor frecuencia fue la pulmonar seguida de la hematológica. Respecto al género femenino, la neoplasia mayormente detectada fue la de mama.

Cuadro # 3. Características de las neoplasias de pulmón obtenidas a partir de las muestras de líquido pleural, tomadas en el Servicio de Neumología del HCG, entre 01 enero del 2019 y el 31 de agosto 2021

Año	Cantidad	Adeno carcinoma	Expresión de mutaciones Adenocarcinomas				Otras estirpes
			SI	NO	No analizado	Insuficiente material	
2019	12	8	3	2	3	0	4
2020	8	7	3	3	0	1	1
2021	4	2	0	2	0	0	2
Totales	24	17	8	7	3	1	7

Cuadro #4. Distribución de los resultados de los estudios moleculares realizadas a las muestras de líquido pleural en búsqueda de neoplasias de los pacientes con cáncer de pulmón, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021.

<i>Estudio molecular</i>	<i>Cantidad (n=24)</i>	<i>%</i>
EGFR (+)	3	3.3%
ALK -	1	1.1%
EGFR (+) mutado en EXON 20	1	1.1%
EGFR (EXON 19 y EXON 21) mutado	2	2.2%
EGFR no mutado	7	7.5%
ALK (+)	1	1.1%
EGFR (-), ALK (-), PDL-1 + 70% de células tumorales	1	1.1%
EGFR; ALK-Ros1-BRAF-MET-RET-HER2(-)	1	1.1%
No realizado	10	10.6%

De las neoplasias pulmonares encontradas (n=24), el 70% (n=17) corresponden a adenocarcinomas, de los cuales al 88 % (n=15) les fue posible realizar análisis molecular de la muestra de LPL. (cuadro #3), obteniendo la detección de mutaciones en 7 de los casos, lo que representa 41% del total de adenocarcinomas encontrados. (ver cuadro #4)

Cuadro #5. Características demográficas y clínicas de los pacientes a los que se estudió la muestra de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021., según presencia de malignidad.

Variable	Malignidad (-)		Malignidad (+) no en LPL		Malignidad (+) en LPL		Valor de p
	n	%	n	%	n	%	
Año							
2019	19	32.2%	18	30.5%	22	37.3%	0.467
2020	28	46.7%	11	18.3%	21	35.0%	
2021	14	38.9%	10	27.8%	12	33.3%	
Grupo de edad							
< 50 años	10	43.5%	8	34.8%	5	21.7%	0.048
50 a 69 años	22	36.1%	9	14.8%	30	49.2%	
≥ 70 años	24	36.9%	21	32.3%	20	30.8%	
Sexo							
Femenino	28	32.6%	21	24.4%	37	43.0%	0.067
Masculino	33	47.8%	18	26.1%	18	26.1%	
Aspecto LPL							
Líquido blanquecido	1	100.0%	0	0.0%	0	0.0%	-
Líquido amarillo	32	48.5%	12	18.2%	22	33.3%	
Líquido anaranjado	3	50.0%	1	16.7%	2	33.3%	
Líquido café claro	0	0.0%	1	50.0%	1	50.0%	
Líquido purulento	0	0.0%	0	0.0%	1	100.0%	
Líquido rojizo	5	13.5%	12	32.4%	20	54.1%	
Líquido verde blanquecino	1	100.0%	0	0.0%	0	0.0%	
Diagnóstico							
Negativo	61	61.0%	38	38.0%	1	1.0%	< 0.001
Positivo	0	0.0%	1	1.8%	54	98.2%	
Citología							
Negativo	61	61.0%	38	38.0%	1	1.0%	< 0.001
Positivo	0	0.0%	1	1.9%	52	98.1%	
BC							
No	8	20.0%	10	25.0%	22	55.0%	0.191
Sí	5	12.8%	5	12.8%	29	74.4%	
IHQ							
No	9	25.7%	9	25.7%	17	48.6%	0.115
Sí	6	12.0%	9	18.0%	35	70.0%	

En cuanto a las diferentes características demográficas y su correlación clínica no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las variables de grupos de edad y género, esto puede deberse a que existe variabilidad en origen tumoral de la muestra, ya que no se está analizando una neoplasia en específico.

Se logra encontrar significancia estadística para realizar el diagnóstico de malignidad a partir de las muestras de líquido pleural (ver cuadro #5)

Cuadro #6. Distribución del volumen de líquido tomado a los pacientes a los que se estudió la muestra de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021.

<i>Valores en cc</i>	<i>Malignidad</i>		
	<i>Malignidad (-)</i>	<i>(+) no en LPL</i>	<i>Malignidad (+) en LPL</i>
Cantidad	46	28	47
Promedio	12.3	17.0	15.1
Desv Std	10.1	8.4	8.4
Mínimo	2.0	6.0	6.0
Máximo	70.0	40.0	50.0
Valor de p	0.082		

Respecto a la cantidad de volumen reportado para el estudio del LPL, existe un amplio rango desde los 2 cc hasta los 70 cc como máximo, con una desviación estándar significativa. Esto puede impactar tanto en el rendimiento diagnóstico, ya que limita al patólogo para poder aplicar diversas técnicas diagnósticas de inmunocitoquímica y molecular por falta de material; como se describe en la literatura, una muestra menor a los 50 cc no cumple con criterios óptimos para poder ser confirmada como negativa por malignidad (2).

Cuadro #7. Evaluación diagnóstica de la citología para el diagnóstico de neoplasias de las muestras de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, tomadas en el Servicio de Neumología del HCG, entre 01 enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021.

<i>Medida</i>	<i>Valor</i>	<i>IC95%</i>	
Sensibilidad	57.6%	47.4%	67.2%
Especificidad	100.0%	94.1%	100.0%
Valor Predictivo Positivo	100.0%	93.2%	100.0%
Valor Predictivo Negativo	61.0%	51.2%	70.0%
Precisión de Diagnóstico	74.5%	67.1%	80.8%

En el análisis de la sensibilidad y especificidad de las citologías obtenidas a partir del líquido pleural, ésta se encuentra cercana al 60% por sí misma. Sin embargo, es importante recalcar una alta especificidad (100%), con un alto valor predictivo positivo.

Cuadro #8. Distribución de los resultados de la IHQ realizadas a las muestras de líquido pleural en búsqueda de neoplasias, en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero de 2019 y el 31 de agosto de 2021.

<i>Tipo de IHQ</i>	<i>Cantidad (n=50)</i>	<i>%</i>
(R) estrogénos (+)	1	2.2%
calretinina (+), CO6 (+) macrofagos	1	2.2%
Calretinina(-)TTF1(-)WT1(-)CD68(+)	1	2.2%
CD 68(+)	1	2.2%
CD20 (+), CD3 (+),	1	2.2%
CD20+/CD3+	1	2.2%
CDX2 (+), CK20 (+), PANCK (+), CK7 -, GATA3 -, napsina -, TTF1 -,	1	2.2%
CK20 (+), CD X2 (+), CK7 -, Calretinina -, TTF1 -	1	2.2%
CK7 (+), CD56 (+), TTF1 (+), CK20-	1	2.2%
CK7 (+), CK20-, CK5 -, Calretinina -, WT1 -, PSA -	1	2.2%
CK7 (+), GATA 3 (+), (R) estrogénos (+), CK20 -, (R) progesterona -	1	2.2%

<i>Tipo de IHQ</i>	<i>Cantidad (n=50)</i>	<i>%</i>
CK7 (+), TTF1 -, CK20 -, P63 -	1	2.2%
CK7 -, PCK -, ecadherina -, (R) estrog y prog (+), CK20 -, KI67 -, HER -	1	2.2%
CK7(+) Calretinina (+)	1	2.2%
CK7(+)/CK56 (-)/CK 20(-)/Calretinina(+)	1	2.2%
CK7(+),calretinina(+),TTF1y P40(-)	1	2.2%
CK7,GATA 3 ; RE +++/CK20 y PG (-)	1	2.2%
FISH (+)	1	2.2%
GATA 3 (+) y PANCK (+)	1	2.2%
GATA 3 (+), mamoglobina (+), (R) estrogénos (+), CDFP15-	1	2.2%
GATA 3 (+), PANCK (+)	1	2.2%
GATA3 (+), (R) estrogénos (+), (7) prog -, HER2 -, KI67 5%	1	2.2%
GATA3 (+), HER2 -, KI67 5%, RE 100% progesterona 5%	1	2.2%
GATA3/RE/CK7/Calretinina(-)	1	2.2%
HER2(-)	1	2.2%
LCA	1	2.2%
P40 (+)	1	2.2%
Panciqueratina (-) / cromoagranina(-) /PS100/Fosf transplacentaria(-)Ag Leuc (+)	1	2.2%
PANCK (+) CK20 -, CK7 (+), TTF1 (+), Calretinina -	1	2.2%
PANCK (+) y LCA negativo	1	2.2%
PANCK (+), CD10 -, calretinina -	1	2.2%
PANCK (+), CK7 (+), CK20 (+), S-100 -, Tenoglobulina -, CK2 -	1	2.2%
PANCK (+), CK7 (+), mamoglobina (+), CK20 -, CK516 -, P63 -, TTF1 (+)	1	2.2%
PANCK (+), CK7 (+), TTF1 (+), CK20 -, WT1 - [se realiza rn BX de tejido pulmonar no en LPL]	1	2.2%
PanCK; CK7,GATA3, RE,RP,TTF1.HER2(-)	1	2.2%
RE (+), GATA 3 (+), Estrogénos (+), CK20 -, 6CD9FPIS -, mamoglobina -, HER 2 -, FISH -	1	2.2%
RE+	1	2.2%
tiroglobulino -, CK20 -, RE -, TTF1 (+), CK7 (+)	1	2.2%
TTF1 (+), CK7 (+), calretinina -, CK20 -, WT proteina -, [se toma en BX de pulmon no en LPL]	1	2.2%
TTF1 (+), CK7 (+), carcinoembrionario (+), CK20 -, villina -	1	2.2%
TTF1 (+), CK7 (+), CK20 -, estrogénos -	1	2.2%
TTF1 (+), CK7 (+), CK20 -, RE -, GATA -, calretinina -	1	2.2%

<i>Tipo de IHQ</i>	<i>Cantidad (n=50)</i>	<i>%</i>
TTF1 (+), CK7 (+), PANCK (+), CK20 -, calretinina	1	2.2%
TTF1 -, CK7 -, calretinina -, CK20 (+), CDX2 (+)	1	2.2%
TTF1 -, WT1 -, calretinina -	1	2.2%
TTF1 y CK7 (+), Calretinina -	1	2.2%

En el cuadro #8 se evidencia que es posible realizar diversos análisis de inmunocitoquímica en las muestras de líquidos pleurales para confirmar el diagnóstico o bien para realizar la identificación de estirpe y origen de la neoplasia. Esto también se ilustra en gráfico #5.

Gráfico #5: Distribución de los resultados obtenidos a partir de las pruebas de inmunohistoquímica realizadas a las muestras de líquido pleural en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero 2019 y el 31 agosto del 2021.

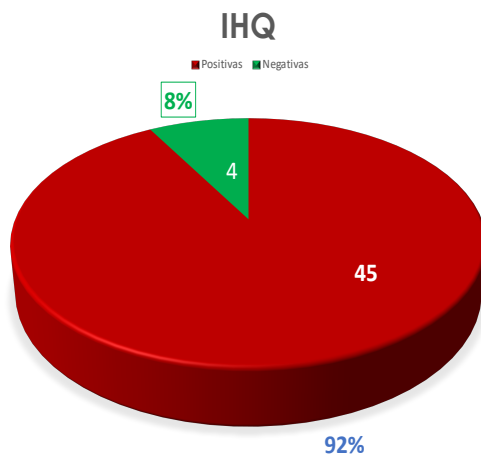


Gráfico #6: Distribución y resultado obtenido a partir de los 39 bloques celulares extraídos del centrifugado del líquido pleural en el Servicio de Neumología del HCG, entre enero 2019 y el 31 agosto del 2021.



En los casos en que se pudo obtener bloque celular se evidencia que éste representa una herramienta diagnóstica más para confirmar malignidad, ya que de los 39 bloques obtenidos en el 89% de ellos (n=33) se encontraron identificar células malignas y establecer diagnóstico.

Discusión

El líquido pleural es una complicación común en pacientes con patología oncológica. Este líquido representa un recurso biológico con significancia clínica, especialmente para aquellos pacientes con estadios avanzados de patología neoplásica y que han perdido su potencial quirúrgico. El líquido pleural puede obtenerse de una manera segura, menos invasiva e incluso con posibilidades de repetirse en el curso terapéutico de ser necesario. Convenientemente, los componentes celulares obtenidos del bloque celular posterior al centrifugado de las muestras de líquido pleural, pueden ser empleados para diagnóstico histológico y molecular. Zhang *et al.* describen que la cantidad de ADN tumoral obtenido del bloque celular y del líquido pleural puede ser incluso mayor que el encontrado en una muestra de tejido (9).

En el presente estudio retrospectivo se analizaron un total de 155 muestras de líquido pleural, de las cuales en 61 casos se obtuvo un resultado negativo por malignidad. En 55 muestras se logra confirmar la presencia de malignidad y su estirpe tumoral.

En 39 de los casos, se obtuvo resultados de líquido pleural negativos por neoplasia, requiriendo por ende la realización de otros métodos diagnósticos en estos pacientes para confirmar la sospecha clínica de malignidad con otro tipo de muestra histológica. El resultado negativo pudo deberse a aspectos como la cantidad de líquido enviada a análisis patológico y la celularidad tumoral entre otros. También podrían corresponder a derrames pleurales paraneoplásicos y no malignos, sin embargo esto no es posible confirmarlo en el presente estudio ya que sería necesaria la realización concomitante de una biopsia de pleura para ello.

En este estudio la neoplasia más frecuentemente evidenciada de manera global fue el cáncer de pulmón, seguido de patología hematológica. Si se agrupa por género, en mujeres el carcinoma de mama fue encontrado con mayor frecuencia y en hombres el cáncer de pulmón; resultados compatibles con lo reportado en la literatura mundial (3,5,6,9). La evidencia de malignidad por medio del líquido pleural es más frecuente en adultos mayores de los 50 años.

Las características macroscópicas documentadas con mayor frecuencia son las serosas y hemorrágicas al igual que lo describe la evidencia (3) donde se anota que un DPM puede ser seroso, serosanguinolento o hemorrágico; con conteos eritrocitarios que suelen oscilar entre 30.000 y 50.000/ul. Conteos mayores a 100.000/ul en ausencia de trauma indican, con una muy alta sospecha, un origen maligno. Esto último producto de invasión directa de los vasos sanguíneos, oclusión de las vénulas, aumento en la permeabilidad capilar consecuencia de la elevada cantidad de citoquinas y quimiocinas, las que producen frecuentemente las características sanguinolentas (3). De los 32 líquidos serosos encontrados, 22 fueron positivos por neoplasia y el 54% (n=20) de los hemorrágicos tenían origen tumoral. Es importante mencionar que en 41 reportes del líquido pleural no estaba descrito el aspecto macroscópico y debe ser un dato importante de anotar por parte del personal médico que realiza la toracocentesis o toma del líquido pleural por otro medio. En el presente estudio no se logró encontrar relación estadística entre el aspecto del líquido y el resultado.

Respecto a la neoplasia de pulmón (24 casos) la estirpe histológica más frecuente fue el adenocarcinoma en un 88% (n=17) de los casos. En la totalidad de pacientes con hallazgos citomorfológicos de adenocarcinoma se logró obtener bloque celular y en quince de ellos fue posible realizar estudios moleculares. En los dos restantes el material fue insuficiente. La importancia principal del bloque celular radica en que este material permite la realización de técnicas de inmunocitoquímica, pero quizás lo más relevante de recalcar es que esta muestra permite la realización de estudios moleculares para la adecuada caracterización tumoral con bajo riesgo de por medio para el paciente.

El empleo de distintas inmunocitoquímicas provee una forma costo efectiva de detección donde, debido a la heterogeneidad tumoral, puede ser incluso más provechoso el análisis del DPL como sitio metastásico, que del origen primario tumoral; esto por la expresión de distintos inmunofenotipos por parte del tumor (7). La solicitud de dichos estudios va a depender del criterio del patólogo y la sospecha diagnóstica que tenga a partir del análisis citomorfológico inicial. En el caso del presente estudio la inmunocitoquímica fue aplicada a

50 de las muestras, en cuatro de los casos ésta permitió descartar el origen neoplásico y en 46 de los casos, confirmarlo.

Por otro lado, determinar la existencia o no de mutaciones específicas tan relevantes en el abordaje y pronóstico de este grupo de pacientes en la actualidad se convierte ahora en una herramienta pivote y es mediante inmunocitoquímica para ALK, ROS1 y recientemente el análisis de la expresión de PD- L1 que logran ser detectadas, las primeras con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 86.3%, y pueden por tanto ser confirmadas mediante técnicas como FISH, PCR o NGS (7).

En el presente análisis se realizaron estudios moleculares a 15 de los 24 pacientes con cáncer de pulmón, logrando determinar en seis casos la mutación EGFR, en un caso se detecta ALK positivo y en un caso se logra demostrar la expresión de PD -L1 tumoral en un 70%. En este subgrupo de pacientes sería posible ofrecer terapia blanco sin necesidad de efectuar otros estudios invasivos. Diversas publicaciones demuestran la capacidad mediante FISH, Sanger, PCR, NGS para detectar anomalías genéticas en muestras de citología y/o bloque celular (3,8,12). En el presente estudio siete pacientes no expresaron anomalías genéticas, estos datos igualmente representan éxito en la aplicación de estudios moleculares en el líquido pleural ya que se trata de tumores “wild type” lo que también define el abordaje del paciente.

El análisis molecular de LPL presenta un interés exponencial que puede extrapolarse a otras entidades como tumores de mama o colorectal (9). En patología mamaria por ejemplo, el uso de diversas ICQ como GATA3, mamaglobina, la proteína líquida de enfermedad quística macroscópica 15 (GCDFP -15) entre otras, otorga sensibilidad diagnóstica de hasta 85% para carcinomas de mama triple negativo y la especificidad alcanzada por la expresión de receptores de estrógenos y progesterona en líquidos serosos es de 100% siempre que exista una apropiada correlación clínica (7).

En los 39 casos donde fue necesario toma de biopsia en otro tejido diversas posibilidades deben tomarse en consideración: que realmente correspondan a un DPM o no, ya que en la actualidad las muestras de líquido pleural no se almacenan en frío luego de ser extraídas esto

puede generar que la integridad celular se modifique y que esto provoque una disminución en la rentabilidad diagnóstica. El volumen promedio documentado en las muestras recogidas fue de 10.1 cc y según las recomendaciones de expertos (2), se debe aportar un mínimo de 50-75 cc para su procesamiento, así como una adecuada preservación de la muestra en medios fríos (2). Al igual que lo describe la literatura, Leichsenring *et al* (9), pueden existir resultados falsos negativos principalmente en tumores paucicelulares (<10% de células). Estos factores no son posibles de demostrar a este momento pero deben considerarse para futuros análisis.

En el presente estudio la citología alcanzó una sensibilidad del 57%, siendo esta similar a la reportada en la literatura en donde se describe del 60% (5,15), con especificidad del 100%; No fue posible en este trabajo calcular la sensibilidad y especificidad en bloque celular, ni en la ICQ debido a que la herramienta estadística requiere de valores que se comparen entre sí en las muestras obtenidas, la mayor parte tanto de los bloques celulares como de las diferentes ICQ realizadas dieron resultado positivo por neoplasias, por lo que se puede concluir que éstas tienen un adecuado valor predictivo en su resultado, sin poder cuantificar una sensibilidad específica para cada una ni determinar el valor predictivo negativo ya que para ello se necesitaría la comparación con biopsias de pleura, lo cual sale del alcance de este estudio.

En la actualidad algunos artículos describen el empleo del supernadante como instrumento de análisis con la finalidad de optimizar y obtener máxima información extraída de la muestra de LPL, sobretodo en casos en que la muestra es hemorrágica y que posterior al centrifugado se separa gran parte de las células benignas y se logra obtener información incluso superior a la del bloque celular para análisis molecular y en menor tiempo que en otro tipo de material (8,12), como se muestra en estudio realizado por Xiang *et al*, donde se analizaron resultados extraídos a partir del supernadante y lo compararon con los obtenidos del bloque celular en pacientes con NSCLC. En nuestro medio el supernadante es hasta ahora descartado para estudios, sin embargo la literatura demuestra que existe una concordancia entre las alteraciones genéticas extraídas del bloque celular y las encontradas en el supernadante de

hasta 83,3%. Un estudio realizado por Xiang *et al* en pacientes con NSCLC (12) demuestra que debe considerarse el uso del supernadante para el análisis sobretodo en muestras paucicelulares (12,9).

En la gráfica # 7 se presenta el proceso que debe seguir la muestra de líquido y se evidencia la riqueza celular que se debe tratar de obtener a partir de ella. (Tomado de 12).

Se propone realizar este estudio pero de manera prospectiva y aplicando las variables de temperatura de almacenaje en frío, volumen, dando utilidad tanto al componente celular como al supernadante de manera homogénea y comparar su resultado en un futuro cercano.

Gráfico # 7: Manejo de la muestra de LPL para análisis molecular

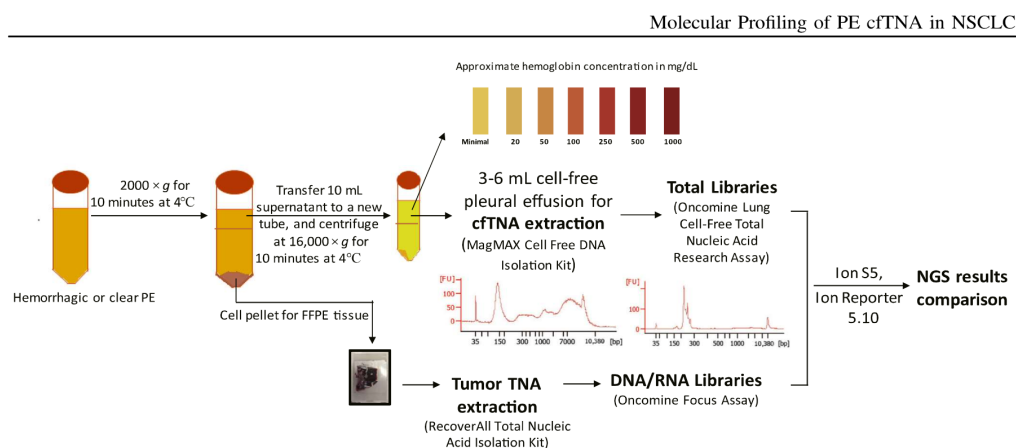


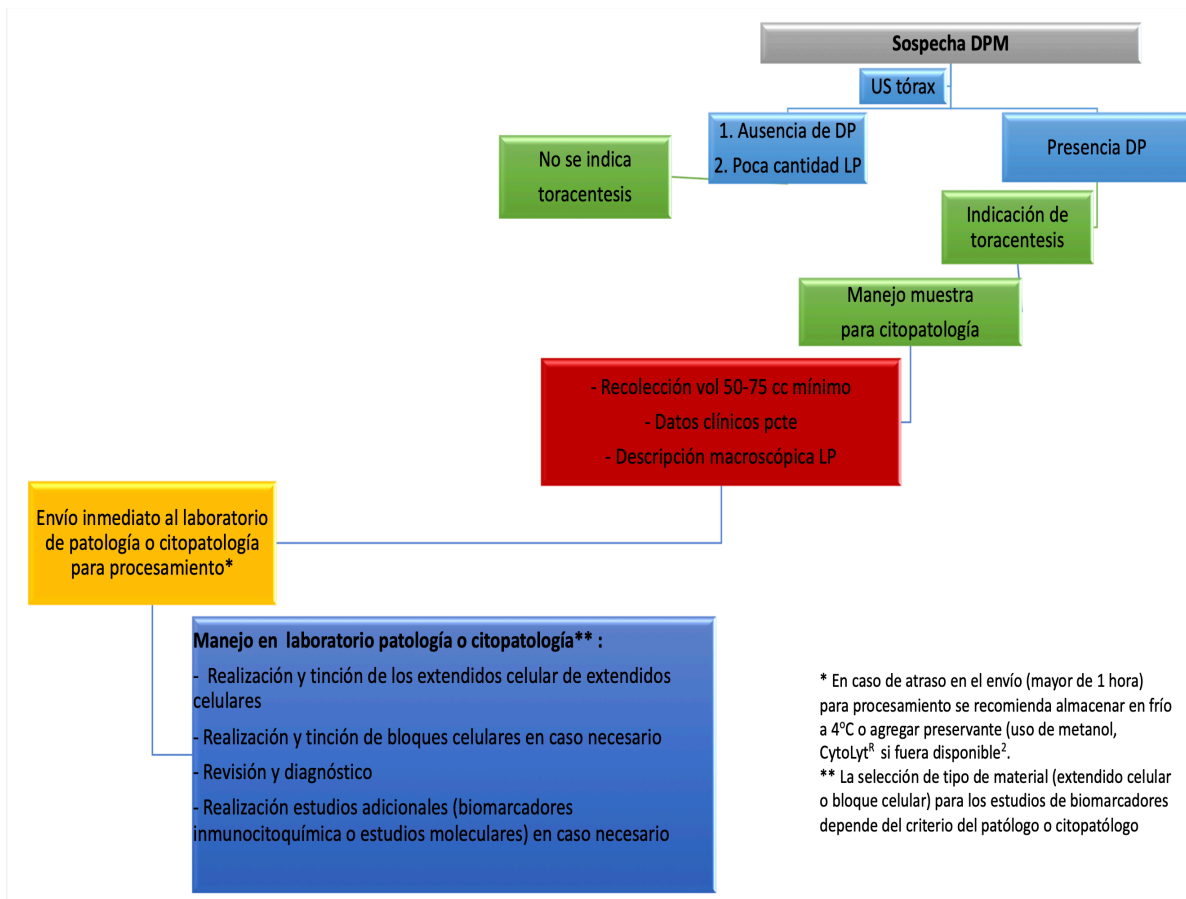
Figure 1 Sketch map for next-generation sequencing (NGS) panel testing from supernatant and matched formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) cell pellet of pleural effusion (PE). Pleural effusion from each patient was collected. Cell pellet was separated during a first run of centrifugation and processed into an FFPE cell block. While supernatant was further centrifuged to remove additional cell debris and used for the evaluation of the approximate hemoglobin concentration, 10 mL cell-free supernatant was stored at -80°C until cell-free total nucleic acid (cfTNA) extraction. Extracted cfTNA from supernatant and DNA/RNA from FFPE cell block were used for the NGS experiments on the Ion Torrent platform using OncoPrint Lung cfTNA and OncoPrint Focus FFPE panels, respectively.

Tomado de: Molecular Profiling for Supernatants and Matched Cell Pellets of Pleural Effusions in Non – Small – Cell Lung Cancer. The Journal Of Molecular Diagnosis. April 2020

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. El análisis de los líquidos pleurales incluidos en el presente análisis logró determinar una sensibilidad del 57% a partir de las citologías para la detección de malignidad, lo cual es acorde con la sensibilidad reportada en otros estudios.
2. Desde el punto de vista macroscópico la mayor parte de líquidos con evidencia de malignidad fueron serosos o hemorrágicos. Es importante realizar esta anotación a la hora de recoger y describir las características de la muestra de líquido obtenido.
3. El cáncer más frecuentemente reportado en este estudio tiene concordancia con el descrito a nivel mundial tanto en hombres (pulmón) como en mujeres (mama).
4. El bloque celular puede considerarse una versión híbrida entre muestra citológica e histológica. Su formación fue útil en 39 de los casos analizados para emitir diagnóstico y permitió el empleo de técnicas auxiliares e incluso análisis molecular a partir de éste. Por lo tanto, se recomienda insistir en el uso de este método diagnóstico siempre que sea posible para aumentar la capacidad de aplicación de técnicas como los estudios moleculares en él.
5. En el estudio se evidencia que existe gran variedad de pruebas aplicables a una muestra de líquido pleural que van desde el análisis citomorfológico, obtención de bloque celular, aplicación de distintas inmunocitoquímicas en el líquido pleural que serán dirigidas a criterio del patólogo así como estudios moleculares que identifiquen mutaciones que sean de alta utilidad para dirigir el manejo.
6. Se aporta propuesta de toma y almacenamiento de la muestra para posterior procesamiento del LPL.

PROPUESTA DE MANEJO Y ALMACENAJE DE LA MUESTRA DE LPL



ANEXOS

ANEXO 1: HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

NÚMERO DE CONSECUTIVO: _____.

EDAD _____.

GÉNERO _____.

Toma líquido pleural fecha realizado: _____

1. VOLUMEN LÍQUIDO RECIBIDO _____ CC 2. ASPECTO LÍQUIDO _____

2. PTE CON MALIGNIDAD DE FONDO: _____

3. CITOLOGÍA:

NEGATIVA: _____

POSITIVA POR: _____

4. BLOQUE CELULAR (POR MALIGNIDAD)

REALIZADO: SI: _____ NO: _____ -

POSITIVO POR:

5. INMUNOHISTOQUÍMICA POR MALIGNIDAD

SI _____ NO _____

CUALES: _____

6. ANÁLISIS MOLECULAR / MUTACIONES ENCONTRADAS:

_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

ANEXO 2: Autorización Comité Ético Científico HCG



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
Hospital Dr. Rafael Ángel Calderón Guardia
Comité Ético Científico
Teléfono: 2212-1000 ext.4037
Correo electrónico: cec.hcg@gmail.com

24 de diciembre de 2021
CEC-HCG-CCSS-0081-12-2021

Doctora
Madga Camacho Alvarado
Investigadora principal

Asunto: Resultado de revisión de Protocolo 1-OB, 17-CV, 22-DECL-TU, 8- PRESUP, 22-COMPR: APROBADO

Tipo de solicitud:	Revisión por cuarta vez
Número(s) de sesión(es):	17-12-2021
Fecha(s) sesión(es):	23-12-2021
Nombre de los miembros del Comité que participaron en la revisión de este protocolo de investigación:	Dr. Ronald Chacón Chaves Dr. Donato Salas Segura MSc. Zeidy Vargas Bermúdez Sra. Sonia Selva Marín
Título de la investigación:	"Utilidad del líquido pleural para el diagnóstico de Neoplasias primarias y metastásicas pulmonares y extrapulmonares a pleura, en el Servicio de Neumología del HCG del 01 enero 2019 a 31 de agosto 2021"
Número protocolo CCSS:	CEC 18-2021
Nombre del investigador principal:	Dra. Madga Camacho Alvarado
Nombre de los sub-investigadores:	Dra. Melissa Masís Quesada
Nombre del patrocinador:	No aplica
Número de protocolo del patrocinador (si aplica):	No aplica
Nombre del CRO (si aplica):	No aplica
Nombre del coordinador (si aplica):	No aplica
Nombre del tutor institucional (solo para investigaciones para optar por un título académico):	No aplica
Nombre de centro(s) asistencial(es) donde se realizará la investigación:	Hospital Dr. Rafael Ángel Calderón Guardia
Número de participantes propuesto por centro(s) asistencial(es):	50 pacientes
Duración de la investigación (en meses):	31 meses
Versión del protocolo revisado:	versión 04, 17 de diciembre 2021
Versión del consentimiento informado revisado (si aplica):	No aplica
Versión del asentimiento informado revisado (si aplica):	No aplica
Versión de la Hoja de recolección de datos	versión 04, 17 de diciembre 2021
Versión del anuncio de publicidad revisado (si aplica):	No aplica
Resolución del comité	APROBADO



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
 Hospital Dr. Rafael Ángel Calderón Guardia
 Comité Ético Científico
 Teléfono: 2212-1000 ext.4037
 Correo electrónico: cec.hcg@gmail.com

Estimada Dra. Madga Camacho Alvarado, me permito trasladarle la resolución del Comité Ético Científico del Hospital Dr. Rafael Ángel Calderón Guardia.

CAPÍTULO III. RESOLUTIVOS.-----

ARTÍCULO 3. Revisión de Protocolo 1-Ob: "Utilidad del líquido pleural para el diagnóstico de Neoplasias primarias y metastásicas pulmonares y extrapulmonares a pleura, en el Servicio de Neumología del HCG del 01 enero 2019 a 31 de agosto 2021". Investigadora principal: Magda Camacho Alvarado. Recibido el diecisiete de diciembre del dos mil veintiuno. Se procede al análisis del protocolo y el Comité indica lo siguiente: Se aprueba.-----

ACUERDO 3. Se procede a la votación de los siguientes señores: Dr. Ronald Chacón Chaves, presidente, profesional con conocimiento en Investigación Biomédica, MSc. Zeidy Vargas Bermúdez, por la Secretaria del Comité y Sra. Sonia Selva Marín, miembro de la comunidad, lo aprueban, por tanto, se acuerda **APROBAR. ACUERDO FIRME**-----

En caso de duda o requerir alguna aclaración, favor comunicarse con Javier Cordero Arias al +506-2212-1000 Ext: 4037 o a las siguientes direcciones electrónicas cec.hcg@gmail.com.

Cordialmente,

**HOSPITAL DR. RAFAEL ÁNGEL CALDERÓN GUARDIA
 COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO**

RONALD ALFREDO CHACON CHAVES
 (FIRMA)

Firmado digitalmente por
 RONALD ALFREDO
 CHACON CHAVES (FIRMA)
 Fecha: 2021.12.24
 10:47:04 -05'00'

**Dr. Ronald Chacón Chaves
 Presidente CEC-HCG-CCSS**

jfca

A QUIEN CORRESPONDA.

La suscrita, **Mag. Lit. Magda Lorena Alvarado Chaves**, cédula 4-0101-0401, Bachiller universitaria en Filología Española, Licenciada y Máster en Literatura, grados obtenidos en la Universidad de Costa Rica, hace constar por este medio, que leí y revisé el Trabajo Final de Graduación para optar al grado de Especialista en Neumología de la Dra. Magda Camacho Alvarado. A mi criterio, en dicho trabajo hay un adecuado uso y manejo del idioma, por lo que desde mi punto de vista no tengo objeciones filológicas que hacerle y, desde esta perspectiva, lo apruebo.

Emito este criterio en la Ciudad de Heredia, el día 10 de marzo de 2022.



Mag Lit. Magda Lorena Alvarado Ch
Cédula 4-0101-0401



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Magda Camacho Alvarado, con cédula de identidad 1-1180-0044, en mi condición de autor del TFG titulado "Utilidad del líquido pleural para el diagnóstico de neoplasias, primarias y metastásicas, pulmonares y extrapulmonares a pleura, en el Servicio de Neumología del Hospital Calderón Guardia del 01 enero de 2019 al 31 agosto del 2021"

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: 03 año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

FIRMA ESTUDIANTE 

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

BIBLIOGRAFÍA

1. Light Richard W, Lee Gary. Textbook of Pleural Diseases. Third Edition. Taylor and Francis Group. 2016
2. Chandra Ashish, Crothers Barbara, Kurtycz Daniel, Schmitt Fernando. The International System for Serous Fluid Cytopathology. Springer Nature Switzerland. 2020
3. Medenica Milic, Medenica Miras, Cosovic Danilo. Pleural. Effusion in Lung Cancer: Detection and Treatment. IntechOpen. 2018
4. Instituto Nacional de Estadística y Censo de Costa Rica. INEC. Febrero 2020
5. Skok Kristijan, Hladnik Gaja, et al. Malignant Pleural Effusion and its Current Management: A Review. Medicina, August 2019
6. Jovanovic Dragana. Etiopathogenesis of malignant pleural effusion. AME Medical Journal. September 2021
7. Lepus Christian, MD, PhD, Vivero Marina. MD. Updates in Effusion Cytology. Surgical Pathology 11 (2018) 523 – 544.
8. Sorolla Maria Alba, Sorolla Anabel, Parisi Eva, Salud Antonieta, Porcel José. Diving into the Pleural Fluid: Liquid Biopsy for Metastatic Malignant Pleural Effusions. Cancers. June 2021
9. Grigoriadou Georgia I, Esagian Stepan, Ryu Han Suk, Nikas Ilias P. Molecular Profiling of Malignant Pleural Effusions with Next Generation Sequencing (NGS): Evidence that Supports Its Role in Cancer Management. Journal of Personalized medicine 2020.
10. Roy – Chowdhuri Sinchita, Mehrotra Meenakshi, et al. Salvaging the supernatant: next generation cytopathology for solid tumor mutation profiling. Modern Pathology USCAP. 2018
11. Roy- Chowdhuri Sinchita, MD PhD. Advances in Molecular Testing Techniques in Cytologic Specimens. Surgical Pathology 11. 2018 669- 67

12. Xiang Chan, Huo Mingfei et al. Molecular Profiling for Supernatants and Matched Cell Pellets of Pleural Effusions in Non – Small – Cell Lung Cancer. *The Journal Of Molecular Diagnosis*. April 2020
13. Pisapia Pasquaie, Pepe Francesco, et al. Next Generation Sequencing in Cytopathology: Focus on Non Small Cell Lung Cancer. *Frontiers in Medicine*. Feb 2021. Vol 8.
14. Yu Gordon, Glaser Laurel, Gustafson Karen. Role of Ancillary Techniques in Fluid Cytology. *Acta Cytologia*. Octubre 2018.
15. Psallidas Ioannis, Kalomenidis Ioannis, et al. Malignant pleural effusion: from bench to bedside. *ERS*. 2016