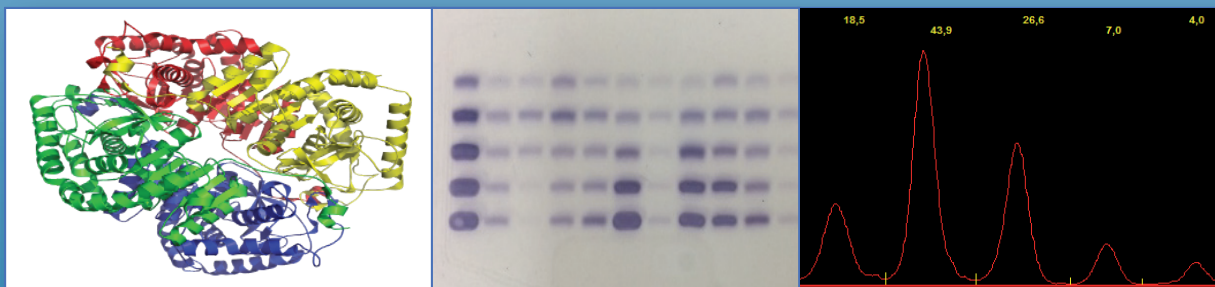


APORTACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE LAS ISOENZIMAS DE LACTATO DESHIDROGENASA AL ESTUDIO DEL LÍQUIDO PLEURAL

MARIA JOSÉ SOLER SEMPERE

Tesis Doctoral



Directores

Dr. Luis M. Hernández Blasco

Dr. Eduardo García Pachón

2017



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA

**APORTACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE LAS
ISOENZIMAS DE LACTATO DESHIDROGENASA AL
ESTUDIO DEL LÍQUIDO PLEURAL**

TESIS DOCTORAL

2017

MARÍA JOSÉ SOLER SEMPERE



Dr. D. Luis Manuel Hernández Blasco, Profesor Titular del Departamento de Medicina Clínica,

Dr. D. Eduardo García Pachón, Profesor Asociado del Departamento de Medicina Clínica,

Directores de la Tesis Doctoral,

CERTIFICAN:

Que Dña. **María José Soler Sempere**, licenciada en Medicina y Cirugía, ha trabajado bajo nuestra dirección y asesoramiento directo en la elaboración de su Tesis Doctoral: “Aportación de la determinación de las isoenzimas de lactato deshidrogenasa al estudio de líquido pleural”, considerando que ésta se encuentra en las debidas condiciones para ser leída y defendida ante el Tribunal correspondiente en esta Universidad.

Lo que firman para los oportunos efectos en Alicante a 19 de mayo de 2017

Fdo. Dr. Luis Manuel Hernández Blasco
Director de Tesis Doctoral

Fdo. Dr. Eduardo García Pachón
Director de Tesis Doctoral



Profesor Dr. D. **Francisco Javier Fernández Sánchez**, Director del Departamento de Medicina Clínica de la Universidad Miguel Hernández,

AUTORIZA:

La presentación y defensa como Tesis Doctoral del trabajo titulado “Aportación de la determinación de las isoenzimas de lactato deshidrogenasa al estudio de líquido pleural” realizado por **Dña. María José Soler Sempere**, bajo la dirección del **Dr. D. Luis Manuel Hernández Blasco** y del **Dr. D. Eduardo García Pachón**.

Lo que firmo en San Juan de Alicante a 19 de mayo de 2017

Fdo. Prof. Dr. Francisco Javier Fernández Sánchez

Director del Dpto. Medicina Clínica



A Jorge

A mis Padres

Agradecimientos

Mi más sincero y profundo agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda y apoyo han colaborado en la realización del presente trabajo.

A mis directores de tesis: el Dr. Luis Hernández, mi querido tutor. Por su constante estímulo, motivación y sabios consejos a lo largo de mi carrera profesional y en el desarrollo de este trabajo. Y el Dr. Eduardo García Pachón. Por sus consejos, motivación, confianza y gran paciencia. Sin sus ideas e inestimable ayuda no hubiera sido posible la realización de esta tesis. Es un orgullo trabajar en tu equipo.

A mis padres, a ellos se lo debo todo.

A Jorge, siempre estás a mi lado, incluso en los momentos más duros de mi vida y mi carrera profesional.

A mis compañeros de Neumología del Hospital de Elche y Alicante. A muchos de ellos les debo mi pasión por la neumología.

Especialmente a Marina y José Francisco del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital General Universitario de Elche. Hubiera sido imposible la ejecución de este trabajo sin vuestra colaboración.

A todos aquellos que, directa o indirectamente, habéis aportado vuestra ayuda para conseguir este objetivo.



Nadie sabe de lo que es capaz hasta que lo intenta

Publius Syrius

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La pleura y el espacio pleural.....	23
1.2. Enfermedades de la pleura.....	26
1.2.1. Generalidades.....	26
1.2.2 Enfermedades benignas de la pleura.....	29
1.2.3. Enfermedades malignas de la pleura.....	31
1.3. Diagnóstico de las enfermedades de la pleura.....	32
1.3.1. Características clínicas.....	32
1.3.2. Aportación de las técnicas de imagen.....	33
Radiografía de tórax	
Ecografía torácica	
Tomografía computerizada torácica	
Resonancia nuclear magnética	
Tomografía por emisión de positrones	
1.3.3. Estudio del líquido pleural.....	37
Toracocentesis	
Biopsia pleural	
1.3.4. Aportación del laboratorio de microbiología.....	40
1.3.5. Anatomía Patológica.....	42
1.3.6. Limitación de los métodos diagnósticos.....	43
1.4. Estudio Bioquímico de líquido pleural.....	46
1.4.1. Generalidades.....	46
1.4.2. Parámetros bioquímicos básicos en líquido pleural.....	47
pH	
Glucosa	
Proteínas	
LDH	
Colesterol	
Adenosín desaminasa	
1.4.3. Estudio bioquímico para la diferenciación entre trasudado y exudado.....	52
1.4.4. Estudio bioquímico en los derrames infecciosos.....	56
Derrame paraneumónico y empiema	
Derrame tuberculoso	
1.4.5. Estudio bioquímico en los derrames malignos.....	62

1.5. Lactato deshidrogenasa en líquido pleural.....	65
1.5.1. LDH. Conceptos generales.....	65
1.5.2. LDH en líquido pleural.....	66
1.5.3. Isoenzimas de LDH.....	68
1.5.4. Estudios de isoenzimas en líquido pleural.....	70
2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....	79
3. OBJETIVOS.....	83
4. MATERIAL Y MÉTODO.....	87
4.1. Ámbito y diseño del estudio.....	87
4.2. Pacientes. Criterios de inclusión	87
4.3 Criterios de exclusión.....	87
4.4. Criterios diagnósticos del derrame pleural.....	88
4.5. Técnica de toracocentesis y biopsia pleural.....	89
4.6. Técnicas microbiológicas en el estudio del derrame pleural.....	90
4.7. Técnicas de anatomía patológica en el estudio del derrame pleural.....	91
4.8. Recuento celular y diferencial de las células del líquido pleural.....	91
4.9. Técnicas bioquímicas en el estudio del derrame pleural.....	91
4.10. Técnica para la determinación de las isoenzimas de LDH.....	92
4.11. Análisis estadístico.....	96
4.12. Conflictos éticos.....	97
5. RESULTADOS.....	101
5.1. Características de los pacientes.....	101
5.2. Etiología de los derrames pleurales.....	101
5.3. Patrones electroforéticos.....	102
5.4. Patrones electroforéticos de isoenzimas de LDH en el derrame pleural.....	104
5.4.1. Trasudados.....	105
5.4.2. Exudados.....	107
Derrames malignos	
Derrame pleural paraneumónico	

Derrames inflamatorios e idiopáticos	
5.5. Aportación de las isoenzimas de LDH para la diferenciación de los distintos grupos diagnósticos.....	118
5.5.1. Trasudados y exudados.....	118
5.5.2. Derrames benignos y malignos.....	123
5.5.3. Exudados benignos y malignos.....	126
5.5.4. Exudados infecciosos y malignos.....	129
5.6. Relación con los hematíes y las células nucleadas del líquido pleural.....	132
6. DISCUSIÓN.....	139
7. CONCLUSIONES.....	155
8. BIBLIOGRAFÍA.....	159



ABREVIATURAS

A: Absorbancia

ADA: adenosina desaminasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

AUC: área bajo la curva ROC

BATEC: radiometric mycobacterial culture system

ROC: Receiver operating characteristics/características operativas del receptor

CA: antígeno carbohidratado

CEA: antígeno carcinoembrionario

CYFRA 21-1: fragmentos de la citoqueratina 19

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

DE: Desviación estándar

DPP: derrame pleural paraneumónico

DPPC: derrame pleural paraneumónico complicado

DPPNC: derrame pleural paraneumónico no complicado

LDH: Lactato deshidrogenasa

LP: líquido pleural

LSN: Límite superior de la normalidad

MODS: Microscopic-observation drug-susceptibility

RNM: resonancia nuclear magnética

ROC: *receiver operating characteristics*

PCR: proteína C reactiva

PET: tomografía por emisión de positrones

UH: Unidades Hounsfield

UI: Unidades internacionales

TC: tomografía computerizada

VIH: Virus inmunodeficiencia humana

VPN: valor predictivo negativo

VPP: valor predictivo positivo

X: media

RELACIÓN DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1.1. Composición del líquido pleural

Tabla 1.2.1.1. Relación de las principales causas de trasudados y exudados pleurales

Tabla 1.4.3.1. Principales parámetros bioquímicos para clasificar trasudados

Tabla 1.4.4.1. Clasificación de Light de los derrames pleurales paraneumónicos y empiemas

5. RESULTADOS

Tabla 5.2.1. Etiología de los derrames pleurales

Tabla 5.2.2. Características bioquímicas de trasudados y exudados

Tabla 5.3.1. Valores absolutos y porcentaje de las isoenzimas de LDH de toda la muestra

Tabla 5.4.1.1. Valores absolutos y porcentaje de isoenzimas de LDH de los trasudados

Tabla 5.4.1.2. Valores absolutos de isoenzimas de LDH y subunidades H y M en los grupos de trasudados

Tabla 5.4.1.3. Porcentaje de isoenzimas de LDH y subunidades H y M en los grupos de trasudados

Tabla 5.4.2.1. Valores absolutos y porcentaje de isoenzimas de LDH y subunidades H y M de los exudados

Tabla 5.4.2.2. Origen de los derrames malignos

Tabla 5.4.2.3. Características bioquímicas de los derrames malignos

Tabla 5.4.2.4. Valores absolutos y porcentaje de isoenzimas de LDH y subunidades H y M de derrames malignos

Tabla 5.4.2.5. Valores absolutos de isoenzimas de LDH y subunidades H y M en adenocarcinoma y no adenocarcinoma.

Tabla 5.4.2.6. Porcentaje de isoenzimas de LDH y subunidades H y M en adenocarcinoma y no adenocarcinoma

Tabla 5.4.2.7. Valores absolutos de Isoenzimas de LDH y subunidades H y M en derrames malignos con citología positiva y negativa

Tabla 5.4.2.8. Porcentaje de Isoenzimas de LDH y subunidades H y M en derrames malignos con citología positiva y negativa

- Tabla 5.4.2.9.** Características bioquímicas de derrames paraneumónicos
- Tabla 5.4.2.10.** Electroforesis de derrames paraneumónicos
- Tabla 5.2.4.11.** Características bioquímicas de derrames paraneumónicos
- Tabla 5.2.4.12.** Valores absolutos de isoenzimas de LDH y subunidades H y M en DPPC y DPPNC.
- Tabla 5.4.2.13.** Valores relativos de isoenzimas de LDH y subunidades H y M en DPPC y DPPNC
- Tabla 5.4.2.14.** Etiología de los derrames de origen inflamatorio e idiopático
- Tabla 5.4.2.15.** Parámetros bioquímicos de los derrames de origen inflamatorio e idiopático
- Tabla 5.5.1.1.** Relación de los derrames con el sexo de los pacientes
- Tabla 5.5.1.2.** Valores absolutos de isoenzimas de LDH y subunidades H y M en trasudados y exudados
- Tabla 5.5.1.3.** Porcentaje de isoenzimas de LDH y subunidades H y M en trasudados y exudados
- Tabla 5.5.1.4.** Área bajo la curva de las isoenzimas de LDH para diferenciar trasudados de exudados
- Tabla 5.5.1.5.** Rentabilidad de la subunidad M de la LDH para diagnosticar trasudados
- Tabla 5.5.2.1.** Valores absolutos de isoenzimas de LDH y subunidades H y M en derrames benignos y malignos
- Tabla 5.5.2.2.** Porcentaje de isoenzimas de LDH y subunidades H y M en derrames benignos y malignos
- Tabla 5.5.2.3.** Área bajo la curva de LDH2, LDH5 y LDH-M para diferenciar derrames malignos
- Tabla 5.5.3.1.** Valores de isoenzimas de LDH y subunidades H y M en exudados benignos y malignos
- Tabla 5.5.3.2.** Porcentaje isoenzimas de LDH y subunidades H y M en exudados benignos y malignos
- Tabla 5.5.3.3.** Valores de isoenzimas de LDH en exudados benignos y malignos con citología negativa
- Tabla 5.5.3.4.** Porcentaje de isoenzimas de LDH en exudados benignos y malignos con citología negativa
- Tabla 5.5.4.1.** Características bioquímicas de derrames paraneumónicos y malignos
- Tabla 5.5.4.2.** Isoenzimas de LDH y subunidades H y M en los exudados infecciosos y malignos
- Tabla 5.5.4.3.** Porcentaje Isoenzimas de LDH y subunidades H y M en los exudados infecciosos y malignos

Tabla 5.5.4.1. Promedio de isoenzimas de LDH \pm SD en exudados infecciosos y malignos

Tabla 5.5.4.4. ABC de las isoenzimas de LDH para diferenciar derrames paraneumónicos de malignos

Tabla 5.6.1. Valores absolutos de LDH, LDH1 y LDH-H y el número de hematíes

RELACIÓN DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1.4.4.1. Fases evolutivas del derrame pleural paraneumónico

Figura 1.5.1.1. Reacción que cataliza lactato deshidrogenasa

Figura 1.5.3.1. Lactato deshidrogenasa (LD, LDH; (S)-lactato-NAD⁺, EC 1.1.1.27

Figura 1.5.3.2. Patrón electroforético y composición de cada una de las isoenzimas de lactato deshidrogenasa

MATERIAL Y MÉTODO

Figura 4.10.1. Alícuotas de líquido pleural.

Figura 4.10.2. Equipo de electroforesis Interlab G26

Figura 4.10.3. Sistema para incubación de los geles con reactivo de tinción para la enzima.

Figura 4.10.4. Bandas de isoenzimas de LDH en gel de agarosa

Figura 4.10.5. Lectura densitométrica de las isoenzimas de LDH

Figura 4.10.6. Cálculo de la subunidades LDH-M y LDH-H

RESULTADOS

Figura 5.3.1. Electroforesis del líquido pleural

Figura 5.4.1. Diagrama con los derrames pleurales divididos por grupos diagnósticos

Figura 5.4.1.1. Causas de trasudado

Figura 5.4.1.2. Electroforesis de un trasudado pleural

Figura 5.4.1.3. Electroforesis de un trasudado pleural

Figura 5.4.2.1. Electroforesis de un exudado pleural

Figura 5.4.2.2. Electroforesis de un derrame maligno

Figura 5.4.2.3. Electroforesis de un derrame paraneumónico no complicado

Figura 5.4.2.4. Electroforesis de un derrame paraneumónico no complicado

Figura 5.5.1.1. Trasudados y exudados

Figura 5.5.1.2. Proporciones de isoenzimas de LDH \pm SD trasudados y exudados

Figura 5.5.1.3. Curvas ROC de isoenzimas LDH para diferenciar trasudados de exudados

Figura 5.5.1.4. Curva ROC de LDH4 para diferenciar trasudados de exudados

Figura 5.5.1.5. Curva ROC de LDH5 para diferenciar trasudados de exudados

Figura 5.5.1.6. Curva ROC de LDH-M para diferenciar trasudados de exudados

Figura 5.5.2.1. Porcentaje de isoenzimas de LDH en los derrames benignos y malignos

Figura 5.5.2.2. Curvas ROC correspondientes a LDH2, LDH5 y LDH-M para diferenciar derrames malignos

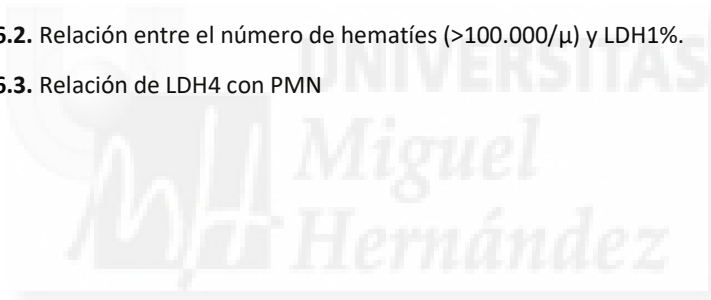
Figura 5.5.3.1. Exudados de origen benigno y maligno

Figura 5.5.4.2. Curvas ROC correspondientes a LDH3, LDH4, LDH5 y LDH-M para diferenciar DPP de malignos

Figura 5.6.1. Relación entre el número de hematíes con LDH y LDH-1

Figura 5.6.2. Relación entre el número de hematíes ($>100.000/\mu$) y LDH1%.

Figura 5.6.3. Relación de LDH4 con PMN





INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA PLEURA Y EL ESPACIO PLEURAL

La pleura es una membrana serosa de origen mesodérmico que recubre el parénquima pulmonar, el mediastino, el diafragma y la superficie interna de la pared torácica. Se divide en pleura visceral y pleura parietal.

La pleura visceral recubre la superficie del pulmón y se invagina hacia el pulmón subyacente formando las cisuras que dividen al pulmón en lóbulos más o menos desarrollados. La pleura parietal recubre la superficie interna de la pared torácica, la cara lateral del mediastino y la superior del diafragma. Aunque constituyen una membrana continua, ambas hojas pleurales se unen en el hilio pulmonar, bajo el cual se localiza el ligamento pulmonar, formado por reflexión de las hojas pleurales hacia el diafragma (Light, 1995). Entre las dos hojas pleurales queda un espacio cerrado, el espacio o la cavidad pleural, de 10-20 μm de ancho. En condiciones normales contiene una pequeña cantidad de líquido pleural claro e incoloro que lubrica y mantiene independiente ambas membranas pleurales, deslizándose una sobre la otra durante los movimientos respiratorios (Sahn, 1988).

La pleura parietal está compuesta por una capa de tejido conectivo laxo cercano a la fascia endotorácica de la pared torácica y está cubierta por una capa única de células mesoteliales. En su interior se encuentran la mayor parte de los vasos sanguíneos y las lagunas linfáticas. La pleura visceral está compuesta por una capa continua de células mesoteliales y una capa compuesta de tejido colágeno denso y tejido elástico que es la principal responsable de la estabilidad mecánica de la pleura (Light, 1995).

La superficie de la pleura visceral y parietal está recubierta por una capa continua de células mesoteliales. Tienen un diámetro de 15-40 μm y alrededor de 5-7 μm de espesor (Wang, 1985). Varían considerablemente de tamaño y forma según la presión transpulmonar. El examen ultraestructural revela que las células mesoteliales están unidas entre sí por uniones estrechas y desmosomas, y la presencia de microvellosidades en su polo apical, con una distribución irregular sobre la superficie pleural, siendo más abundantes en las regiones caudales de la pleura visceral. Las células mesoteliales son activas metabólicamente y pueden producir componentes del tejido conectivo submesotelial, factores quimiotácticos para neutrófilos (Goodman *et al.*, 1992) y sustancias con actividad fibrinolítica (Whitaker *et al.*, 1982) y procoagulante (Idell *et al.*, 1992).

La pleura visceral carece de receptores nerviosos, en cambio, la pleura parietal posee fibras sensitivas que provienen de los nervios intercostales y del nervio frénico, responsable del dolor cuando se afecta o irrita por cualquier estímulo. Ambas pleuras reciben su irrigación desde la circulación sistémica. La pleura parietal recibe su vascularización a través de las ramas de las arterias que derivan de las subclavia, mamaria interna e intercostales. La pleura visceral está irrigada por la circulación bronquial. En cuanto al drenaje venoso, la pleura visceral drena en las venas pulmonares, mientras que el de la pleura parietal llega hasta la vena cava inferior o el tronco braquiocefálico (Sahn *et al.*, 1988).

Existen diferencias en el drenaje linfático de ambas superficies pleurales. El sistema linfático de la pleura parietal es la vía de drenaje más importante de líquido y células del espacio pleural. Numerosos estomas comunican la cavidad pleural con unos espacios lacunares de donde parten los vasos linfáticos (Wang, 1975). En cambio, la pleura visceral carece de estomas y lagunas, y sus vasos linfáticos parecen drenar al parénquima pulmonar más que a la cavidad pleural. Estudios

recientes han demostrado que la pleura visceral tiene un papel limitado en la absorción de líquido.

La pleura tiene como función principal facilitar el movimiento de los pulmones armonizando las fuerzas elásticas y no elásticas torácicas y pulmonares, con el fin de disminuir el gasto energético de los movimientos de expansión y retracción pulmonar. Esto es posible gracias a la existencia de una presión intrapleural negativa, producto de la diferencia entre las fuerzas elásticas de la pared torácica y los pulmones que evita el colapso del pulmón, y a que las dos hojas pleurales se deslizan una sobre la otra gracias a la presencia de una fina capa de líquido pleural.

El líquido pleural es un ultrafiltrado del plasma que contiene alrededor de 1.500 células/mm³ compuestas por 70 % de monocitos, 11 % linfocitos, 9 % células mesoteliales, 8 % macrófagos y un 2 % leucocitos polimorfonucleares (Sahn *et al.*, 1979). Es un líquido claro, incoloro con una concentración de proteínas inferior a 1,5 g/dl, ligeramente alcalino respecto al plasma, con concentraciones de glucosa y potasio similares a las del suero (Rolf *et al.*, 1973) (Tabla 1.1.1).

Tabla 1.1.1. Composición del líquido pleural	
Volumen	0,1-02 mL/Kg de peso
Células/mm ³	1000-5000
Proteínas	1-2 g/dL
Albúmina	50-70 %
Glucosa	70 -110 mg/dL (similar al plasma)
LDH	<50 % de valor de plasma
pH	mayor que plasma

La cavidad pleural, en condiciones normales, contiene un volumen de líquido pleural entre 0,1-0,2 ml/kg de peso corporal. El líquido pleural se mantiene en continuo cambio, pero su volumen es constante. Es el resultado del equilibrio entre su formación y su reabsorción que se mantiene gracias al balance de las presiones hidrostáticas y oncótica entre los capilares viscerales y parietales, a la integridad de la serosa y al drenaje linfático (Sahn *et al*, 1979; Light, 2013).

1.2. ENFERMEDADES DE LA PLEURA

1.2.1 Generalidades

El derrame pleural es el resultado de un incremento de líquido en el espacio pleural. Representa el 4 -10 % de las enfermedades neumológicas y la prevalencia es aproximadamente de 414 casos/100.000 habitantes/año. Generalmente está relacionado con una enfermedad propiamente pleural, pulmonar o sistémica (Villena *et al.*, 2006; Hooper *et al.*, 2010). La causa más frecuente es la insuficiencia cardíaca congestiva, y entre los exudados, el derrame pleural paraneumónico, el neoplásico o el secundario a tromboembolismo pulmonar (Villena, 2006).

El desarrollo de un derrame pleural requiere tanto de un aumento de la formación como de una disminución de la absorción de líquido pleural. Clásicamente, se han descrito seis mecanismos potenciales de una acumulación de líquido pleural (Sahn, 1996):

- Aumento de la presión hidrostática de la circulación microvascular. Este mecanismo es el que predomina cuando aumentan la presiones capilares a

- nivel de la circulación pulmonar y es el responsable en el caso de derrame pleural en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva
- Disminución de la presión oncótica en la microcirculación. Se observa en pacientes con descenso del contenido proteico del suero que disminuye la reabsorción de líquido hacia el espacio intersticial. Es el caso del derrame secundario al síndrome nefrótico, hepatopatía crónica o desnutrición.
 - Disminución de la presión en el espacio pleural. La causa más frecuente es la obstrucción bronquial que se acompaña de atelectasia pulmonar.
 - Aumento de la permeabilidad de la microcirculación. Se produce cuando la pleura está directamente implicada en el proceso patológico.
 - Alteración del drenaje linfático del espacio pleural. La causa más frecuente de la disminución de la absorción es la obstrucción de los linfáticos en la pleura parietal. Es uno de los mecanismos más importantes en el desarrollo de los derrames pleurales malignos.
 - Filtrado del líquido desde el espacio peritoneal. A través de los linfáticos y los defectos diafragmáticos de pequeño tamaño hacia el espacio pleural. Se puede observar en los derrames secundarios a ascitis u obstrucción urinaria.

Los trasudados pleurales son el resultado de un desequilibrio entre las fuerzas hidrostáticas y oncóticas en la circulación pulmonar o sistémica. Las superficies pleurales están intactas y se identifica la causa en enfermedades extrapleurales. Se caracterizan por tener un bajo contenido celular y escasa concentración proteínas. Los trasudados se deben mayoritariamente a insuficiencia cardiaca (80 %) y, en menor medida a la cirrosis hepática.

Sin embargo, un exudado pleural se produce por un aumento de la permeabilidad vascular y/o del drenaje linfático, que conllevan un incremento de proteínas intrapleurales. La superficie pleural se encuentra afectada y puede

deberse a numerosas etiologías. Las principales causas de trasudados y exudados pleurales se señalan en la tabla 1.1.2 (Light, 2013).

Tabla 1.2.1.1. Principales causas de trasudado y exudado pleural

Trasudados	Exudados
Insuficiencia cardíaca congestiva	Enfermedades malignas
Cirrosis hepática	Metástasis
Síndrome nefrótico	Mesotelioma
Obstrucción vena cava superior	Enfermedades infecciosas
Urinotórax	Infección bacteriana
Diálisis peritoneal	Tuberculosis
Mixedema	Infección por hongos, parásitos y virus
Fístula de líquido cefalorraquídeo	Embolismo pulmonar
Sarcoidosis	Enfermedades gastrointestinales
	Enfermedad pancreática
	Abscesos intraabdominales
	Perforación esofágica
	Postcirugía abdominal
	Enfermedades cardíacas
	Enfermedades del pericardio
	Síndrome de Dressler
	Enfermedades del colágeno
	Artritis reumatoide
	Lupus eritematoso sistémico
	Síndrome de Churg-Strauss
	Síndrome de Sjögren
	Granulomatosis de Wegener
	Enfermedades ginecológicas
	Síndrome de hiperestimulación ovárica
	Síndrome de Meigs
	Endometriosis
	Drogas
	Miscelánea
	Exposición a asbesto
	Sarcoidosis
	Síndrome de las uñas amarillas
	Yatrogénico
	Uremia
	Hemotórax
	Quilotórax

1.2.2 Enfermedades benignas de la pleura

Existen una gran variedad de derrames pleurales no neoplásicos, destacando por su frecuencia, los trasudados, derrame pleural paraneumónico, pleuritis tuberculosas y exudados pleurales idiopáticos.

La causa que con mayor frecuencia produce un trasudado pleural es la insuficiencia cardiaca congestiva, seguida del hidrotórax hepático. El derrame pleural por insuficiencia cardiaca congestiva es la causa más frecuente de derrame pleural en los países desarrollados. Se produce por aumento de la presión hidrostática en la circulación venosa sistémica y sus manifestaciones clínicas son las de la enfermedad causante. En la mayoría de los casos son bilaterales aunque habitualmente de predominio derecho (Race *et al.*, 1957). Generalmente se trata de un trasudado con proteínas inferiores a 3 g/dL y con una LDH inferior a 200 UI/L. Cuando los pacientes reciben tratamiento diurético puede transformarse y presentar características de exudado (Romero *et al.*, 2001).

El derrame pleural paraneumónico representa la causa más frecuente de exudado pleural. Se asocia a una neumonía bacteriana, a un absceso pulmonar o bronquiectasias (Light *et al.*, 1973). Se ha observado que hasta un 40 % de las neumonías bacterianas que requieren ingreso hospitalario desarrollarán un derrame pleural paraneumónico (Light *et al.*, 1980) y un 5-10 % empiema. Es más frecuente en ancianos y niños, y su presencia aumenta la morbimortalidad de estos pacientes. Los microorganismos aislados con más frecuencia en la neumonía adquirida en la comunidad son los aerobios grampositivos y anaerobios, mientras que los estafilococos y aerobios gramnegativos se asocian con la neumonía nosocomial (Ferreiro *et al.*, 2015). El líquido se acumula en el espacio pleural por la reacción inflamatoria subpleural y es rico en polimorfonucleares.

Aunque su incidencia está disminuyendo en España, el derrame pleural tuberculoso es la causa más frecuente de tuberculosis extrapulmonar en nuestro país (Ferreiro *et al.*, 2014). La tuberculosis pleural representa entre el 10-15 % de los derrames y se estima que la pleura está afectada en el 23 % de todos los pacientes con tuberculosis (Vidal *et al.*, 1986). Generalmente es el resultado de la rotura de un foco caseoso pulmonar subpleural en el espacio pleural tras una primoinfección tuberculosa, aunque puede ser secundario a la reactivación de la enfermedad. El derrame es casi invariablemente un exudado con proteínas elevadas, sin eosinofilia y típicamente presenta escasas células mesoteliales (Light, 2010). Aunque suele existir un predominio linfocítico en el 90 % de las ocasiones, en los primeros días puede ser polimorfonuclear.

El tromboembolismo pulmonar, probablemente sea la cuarta causa más frecuente de derrame pleural tras la insuficiencia cardiaca congestiva, las neumonías y las neoplasias con una incidencia estimada en EE.UU de 150.000 a 250.000 al año. A pesar de que su presencia se puede detectar en el 30-50 % de los pacientes con tromboembolismo pulmonar, se describe en menos del 5 % en las series sobre la etiología del derrame pleural (Villena *et al.*, 2002), porque se considera que la causa es obvia y no suele ser necesaria una toracocentesis. El líquido pleural es un exudado, frecuentemente hemático, suele presentar una marcada hiperplasia mesotelial y asociarse a eosinofilia (Romero *et al.*, 2002).

La incidencia de derrame pleural debido a las enfermedades sistémicas en nuestro país es aproximadamente del 1 % (Villena *et al.*, 2002). Las entidades más frecuentes son la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico. En su producción existe un mecanismo inmunológico y una inflamación pleural mediada por la activación del complemento y el incremento de la permeabilidad capilar de las vasculitis (Light, 2013).

1.2.3 Enfermedades malignas de la pleura

El derrame pleural maligno representa entre el 15 y el 35 % de todos los derrames pleurales (Villena *et al.*, 2014), y es la principal causa de exudado en mayores de 60 años. Se diagnostica por la demostración de células malignas en el líquido o tejido pleural o cuando está asociado a una enfermedad maligna conocida sin que exista un diagnóstico alternativo (Romero *et al.*, 1996).

La pleura se puede ver afectada por tumores originados en la propia pleura, o más frecuentemente, por metástasis tumorales de otros órganos. El cáncer de pulmón es responsable de más de una tercera parte de los derrames pleurales malignos (Porcel *et al.*, 2014) seguido de la mama (25 %) o los linfomas, aunque cualquier tumor puede ocasionarlo. Dependiendo de la exposición al asbesto, el mesotelioma, puede suponer la tercera causa de derrame pleural maligno (Villena *et al.*, 2014).

La afectación pleural puede producirse directamente por contigüidad de un tumor originado en órgano próximo, invasión linfática o diseminación hematogena a pleura parietal directamente. Pero lo más frecuente es que se trate de metástasis pleurales hematogenas. Las células neoplásicas llegarían por vía sanguínea al pulmón, embolizarían a la pleura visceral y después se extenderían a la cavidad pleural con afectación secundaria de la pleura parietal.

El derrame pleural maligno puede ser seroso, serohemático o hemático. El número de hematíes suele encontrarse entre 30.000 y 50.000/mm³ y el recuento de leucocitos suele estar entre 1.000 y 10.000/mm³. En el 45 % de los casos predominan los linfocitos, en el 40 % otras células mononucleadas y en el 15 % los polimorfonucleares. En la mayor parte de los casos es un exudado, pero puede ser

un trasudado en estadios iniciales. La presencia de un trasudado pleural en pacientes con metástasis pleurales es excepcional. En estos casos suelen asociarse a insuficiencia cardíaca, atelectasia pulmonar, cirrosis hepática u obstrucción linfática (Sahn, 1998). Cuando las cifras de glucosa están por debajo de 60 mg/dL y el pH de 7,30, indica enfermedad avanzada y las posibilidades de obtener una citología o biopsia positiva son más elevadas

El pronóstico en general es malo, con una mediana de supervivencia de 3-6 meses. Se relaciona con el tumor de origen, un pH pleural menor de 7,28, una glucosa pleural menor de 60 g/dL, una LDH elevada, una amilasa muy elevada en líquido pleural, o un peor estado clínico (Antony *et al.*, 2000).

1.3. DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES DE LA PLEURA

El diagnóstico de un derrame pleural se basa en una aproximación inicial basada en los datos obtenidos en la anamnesis, la exploración física y otras exploraciones no invasivas, y en el estudio del líquido pleural mediante toracocentesis.

1.3.1 Características clínicas

El derrame pleural puede ser asintomático hasta en un 16 % de los casos (Smyrniotis *et al.*, 1990) o manifestarse con disnea, dolor torácico o tos seca.

La disnea es el síntoma más frecuente y puede estar relacionada con el tamaño del derrame y la existencia de enfermedad pulmonar subyacente. El desplazamiento del mediastino que ocurre en el hidrotórax a tensión puede provocar dificultad respiratoria, disfagia, ingurgitación de las venas del cuello y

edemas en miembros inferiores (DeSouza *et al*, 1977). El dolor pleurítico es el síntoma más característico, suele ser ipsilateral, localizado sobre la zona pleural afectada o irradiado al hombro homolateral cuando las terminaciones nerviosas del nervio frénico están irritadas por la inflamación de la pleura diafragmática.

La exploración física revela matidez a la percusión, con una disminución o ausencia de los ruidos respiratorios y de las vibraciones vocales. Cuando el derrame es de escasa cuantía o se está resolviendo puede escucharse un roce pleural secundario al deslizamiento entre sí de las superficies pleurales.

1.3.2. Aportación de las técnicas de imagen

La primera exploración a realizar ante un paciente con sospecha de derrame pleural es la radiografía de tórax. Otras técnicas como la ecografía, la tomografía computerizada (TC), la resonancia nuclear magnética (RNM) y la tomografía de emisión de positrones (PET) son técnicas complementarias en la evaluación y manejo posterior.

Radiografía de tórax

Aunque la radiografía de tórax es la primera exploración a realizar en el estudio de un derrame pleural, presenta unas limitaciones condicionadas fundamentalmente por la cantidad de líquido. Suele ser necesaria la acumulación de al menos 175 mL de líquido pleural para que se produzca un borramiento detectable del seno costofrénico lateral en la proyección posteroanterior (Collins, 1972). Para demostrar cantidades más pequeñas de líquido pleural, la proyección en decúbito lateral es más sensible que la proyección en bipedestación (Moskowitz *et al.*, 1973). El derrame pleural puede estar libre o loculado y presentar una localización típica, con la característica curva ascendente o de Damoiseau, o atípica

por una acumulación de líquido a nivel subdiafragmático, cisural, o mediastínico. Su apariencia depende de la cantidad de líquido, la posición del paciente y la presencia o no de adherencias entre la pleura visceral y la parietal (Villena *et al.*, 2006). La radiografía de tórax también puede aportar información adicional sobre la causa del derrame (Porcel *et al.*, 2003), y es la exploración más utilizada para la detección de complicaciones tras la toracocentesis (Alemán *et al.*, 1999).

Ecografía torácica

La ecografía torácica ha demostrado una gran utilidad en el estudio de la patología pleural. Es más precisa (sensibilidad del 100 % y especificidad del 99,7 %) que la radiografía convencional para detectar derrame pleural, ya que permite visualizar líquido a partir de 5 mL (Gryminiski *et al.*, 1976). Entre sus principales ventajas destacan la ausencia de radiaciones, bajo coste económico, valoración en tiempo real y la posibilidad de realizar la exploración en la cabecera del paciente. La imagen ecográfica del derrame pleural depende de su naturaleza, causa y cronicidad. Por las características ecográficas puede dividirse en anecoico, homogéneamente ecogénico y complejo, septado o no (Chira *et al.*, 2011). Aunque la ecografía no es capaz de establecer un diagnóstico definitivo, puede orientar la etiología del derrame pleural. La presencia de ecos, septos o nódulos orienta a un exudado, en cambio un líquido anecoico, no permite determinar que se trate de un trasudado (Yang *et al.*, 1992).

Se ha demostrado que la ecografía es más sensible que la TC para demostrar la existencia de septos en el interior de un derrame pleural (Kearney *et al.*, 2000) y se ha mostrado superior a la radiografía convencional y a la TC en el manejo del derrame pleural metaneumónico complicado (Svigals *et al.*, 2016). Otra de las ventajas que ofrece la ecografía torácica es su capacidad para diferenciar pequeñas cantidades de líquido del engrosamiento pleural (Wernecke, 2000). La presencia de

un engrosamiento pleural mayor a 1 cm, nodularidad en la pleura o de un engrosamiento diafragmático mayor a 7 mm, sugieren un origen maligno con una sensibilidad del 79 % y una especificidad del 100 % (Qureshi *et al.*, 2009). Además, la ecografía constituye una guía para procedimientos invasivos, con una mayor rentabilidad y menor riesgo de complicaciones (Jones *et al.*, 2003), y presenta una tasa de éxito en la obtención de muestras histológicas de lesiones pleurales del 80 % (Benamore *et al.*, 2006).

Tomografía computerizada torácica

La TC torácica detecta pequeñas cantidades de líquido y ayuda a caracterizar mejor la localización y la disposición del derrame. Permite diferenciar la patología pleural de la pulmonar, determinar la patología subyacente y definir el derrame como libre o loculado.

La TC con contraste puede ayudar en la diferenciación entre exudados y trasudados (Aquino *et al.*, 1994; Arenas-Jiménez *et al.*, 2000) y puede ser de utilidad para distinguir derrames malignos y benignos. La presencia de nódulos pleurales y engrosamiento pleural nodular es altamente sugestiva de malignidad (Arenas-Jiménez *et al.*, 2000; Trail *et al.*, 2001). En el empiema pleural, el signo radiológico más relevante es el refuerzo de la pleura visceral y parietal, con desplazamiento de los vasos circundantes (signo de la pleura escindida), lo que permite diferenciarlo del absceso pulmonar (Waite *et al.*, 1990). Además, el engrosamiento de la pleura y la atenuación de la grasa subcostal sugieren infección de la cavidad pleural (Heffner *et al.*, 2010).

La TC puede servir como guía para la colocación de drenajes pleurales (Hooper *et al.*, 2010) o la realización de biopsias pleurales (Maskell *et al.*; 2003).

Resonancia nuclear magnética

El derrame pleural puede identificarse con resonancia nuclear magnética (RNM) con una resolución ligeramente superior a la TC torácica. En general, en los estudios T1 aparece como una señal hipointensa mientras que en las secuencias T2 la intensidad de señal aumenta como consecuencia de su contenido en agua (Light, 2013). La intensidad de señal depende además, de la concentración lipídica y protéica, de la existencia de productos del catabolismo de la hemoglobina. De tal forma que los quilotórax podrían presentar una señal similar a la de la grasa subcutánea y los derrames hemáticos una señal de muy alta intensidad tanto en T1 como en T2 (Mc Loud *et al.*, 1991). Sin embargo, sus características no son suficientes para establecer un diagnóstico (Light, 2013).

Las imágenes de la RNM permiten realizar un análisis detallado de las capas de la pared torácica y de su posible infiltración por un proceso maligno o inflamatorio. En el mesotelioma pleural maligno, la RNM ha demostrado su utilidad en el estudio de extensión, permitiendo distinguir tejido tumoral de colecciones de líquido adyacente y su extensión al mediastino, pared torácica o abdomen (Pessoa *et al.*, 2016)

Hay estudios que afirman que puede ser superior frente a la TC para distinguir derrames pleurales malignos de benignos (Hierholzer *et al.*, 2000). Además, se ha observado que los derrames pleurales paraneumónicos no complicados no parecen inducir cambios en la pared torácica, mientras que los derrames complicados y los empiemas pueden mostrar una infiltración de la pared

torácica similar a la que provocan las enfermedades malignas (Hamm *et al.*, 1997). Sin embargo, el papel de la RNM en el estudio del derrame pleural es limitado debido a la pobre resolución espacial, artefactos de movimiento y elevado coste.

Tomografía de emisión de positrones

La tomografía por emisión de positrones con 18-fluordesoxiglucosa (FDG-PET), puede aportar información en el estudio del derrame pleural. Su mayor utilidad se basa en el estudio del derrame pleural maligno donde tiene una sensibilidad del 97 % y una especificidad del 89 % (Duysinx *et al.*, 2004). Debido a su elevado valor predictivo negativo, su papel más relevante en el manejo del derrame pleural maligno, es su capacidad para descartar lesiones malignas.

Presenta falsos positivos en lesiones inflamatorias o infecciones metabólicamente activas que limitan su uso. Los falsos negativos son menos frecuentes e incluyen tumores con baja actividad metabólica, como el tumor fibroso de crecimiento lento, linfoma y metástasis de cáncer de próstata (Qureshi *et al.*, 2006).

1.3.3. Estudio del líquido pleural

El estudio del líquido pleural ofrece una información adicional para confirmar, o modificar el diagnóstico de presunción establecido a través de los datos clínicos y radiológicos.

Toracocentesis

La toracocentesis es la extracción de líquido pleural con fines diagnósticos o terapéuticos. Es una técnica sencilla, con baja morbilidad, que obtiene el diagnóstico hasta en el 75 % de los casos (Collins *et al.*, 1987). Está indicada en todo paciente con derrame pleural de causa no conocida y en casos de insuficiencia cardiaca, cuando se presentan con derrame unilateral, dolor torácico y fiebre (Light, 2013). No existen contraindicaciones absolutas (Sahn, 1988), pero conlleva riesgo de sangrado en caso de plaquetopenia inferior a 50.000/mm³. Sus complicaciones más frecuentes son la reacción vagal (10-14 %) y el neumotórax (3-8 %) (Seneff *et al.*, 1986), aunque se ha observado que la experiencia del explorador disminuye de forma sensible el riesgo (Bartter *et al.*, 1993).

El estudio inicial del líquido debe considerar su aspecto y olor. Las características macroscópicas del líquido obtenido mediante toracocentesis pueden orientar hacia determinadas etiologías. La obtención de un líquido de aspecto hemático hará más probable un origen maligno (Villena *et al.*, 2004), un tromboembolismo pulmonar (Romero *et al.*, 2002) o un traumatismo. Un aspecto lechoso hará sospechar un derrame de origen lipídico y la presencia de pus se considera diagnóstica de empiema. El aspecto achocolatado o francamente negro puede corresponder principalmente a una infección fúngica, amebiasis, metástasis de melanoma o líquido biliar (Sanh, 2012; Saraya 2013; Soler-Sempere *et al.*, 2015). Del mismo modo, el olor puede ayudar al diagnóstico; si tiene un olor pútrido hará sospechar una infección por microorganismos anaerobios y si es amoniacal orientará a un urinotórax (García-Pachón *et al.*, 2004).

Biopsia pleural

La realización de una biopsia pleural está indicada en los pacientes con derrame pleural de etiología desconocida, especialmente si se sospecha un derrame

de origen maligno o tuberculoso. Con esta técnica se obtienen muestras de tejido pleural para estudio microbiológico y anatomopatológico. Se puede obtener por diferentes vías:

Biopsia pleural transparietal o con aguja

La biopsia pleural transparietal fue introducida en la década de los cincuenta. Consiste en la obtención de muestras de tejido pleural parietal usando una aguja insertada a través de la pared torácica. En 1958 se describieron las agujas de Cope (Cope, 1958) y Abrams (Abrams, 1958) y posteriormente lo hizo Castelain (Castelain, 1964). Es el método más sencillo para la obtención de muestras de tejido pleural. Se realiza con anestesia local y está contraindicada en los casos de plaquetopenia inferior a 50.000 μ L, infección cutánea de la zona de incisión, insuficiencia respiratoria y escasa cuantía del derrame. Se recomienda obtener al menos 4 fragmentos de pleura parietal para el estudio anatomopatológico, y uno para cultivo de tuberculosis (Jiménez *et al.*, 2002).

La biopsia pleural con aguja Tru-cut (Mc Leod *et al.*, 1989) está especialmente indicada en los pacientes con sospecha de neoplasia. Esta técnica permite realizar biopsias obteniendo cilindros de tejido de 1-2 cm de longitud. En estos casos puede incrementarse el rendimiento diagnóstico cuando se dirige por un TC torácica o ecografía y se identifican áreas de engrosamiento pleural o nódulos (Maskell *et al.*, 2003).

Las complicaciones de la biopsia pleural son similares a las de la toracocentesis. El neumotórax ocurre alrededor de un 5 % de los casos y el hemotórax en menos de un 2 % (Villena *et al.*, 2005). La siembra tumoral en el

trayecto de la biopsia sólo es frecuente en el mesotelioma pleural (West *et al.*, 2006).

Toracoscopia

La toracoscopia consiste en la visualización de la cavidad pleural y permite la obtención de muestras de la pleura parietal y visceral de forma dirigida. Se realiza a través de la pared torácica con unas mínimas incisiones. Su principal indicación es el estudio de los exudados pleurales de etiología desconocida. Con esta técnica se obtiene una rentabilidad diagnóstica del 93 % para el derrame pleural maligno y ofrece la posibilidad de realizar una pleurodesis química dirigida durante el procedimiento (Hooper *et al.*, 2010).

En el manejo de los derrames pleurales paraneumónicos complicados, la toracoscopia en fase precoz, permite desbridar la cavidad y la colocación guiada del drenaje pleural con menos complicaciones y comorbilidad que la cirugía, y que un drenaje pleural en el empiema crónico (Chambers *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013).

1.3.4. Aportación del laboratorio de microbiología

El estudio microbiológico del líquido pleural debe realizarse en los exudados no diagnosticados. Las muestras deben ser remitidas al laboratorio en condiciones de anaerobiosis, para realizar determinaciones de gérmenes aerobios, anaerobios, micobacterias y hongos (Porcel, 2001; Light, 2013). El rendimiento del estudio microbiológico de los derrames pleurales paraneumónicos es del 19 % (Jiménez *et al.*, 2006). Sin embargo, la rentabilidad se incrementa si las muestras son inoculadas a pie de cama en los medios habituales que se emplean en los hemocultivos (Menzies *et al.*, 2011).

En los casos con sospecha de tuberculosis pleural, la rentabilidad de la determinación de micobacterias es baja. La tinción para micobacterias es positiva en menos del 5 % de los casos. Sin embargo, en los VIH positivos la tinción puede ser positiva en el 20 % (Valdés *et al.*, 1998; Heyderman *et al.*, 1998). El cultivo del líquido pleural tiene una mayor rentabilidad, dependiendo del medio que se utilice. Con medios sólidos, el cultivo de Löwenstein-Jensen es positivo en el 12 al 36,6 % de los casos (Ferreiro *et al.*, 2014). En cambio, sembrar el líquido en medio de cultivo líquido (BACTEC) aumenta la rentabilidad del cultivo del 12 al 24 % (Ruan *et al.*, 2012) y acelera el diagnóstico 2-3 semanas respecto al cultivo convencional de Löwenstein. El cultivo MODS permite una mayor rapidez en los resultados y proporciona simultáneamente datos de susceptibilidad a fármacos. Es más rentable que el de Löwenstein-Jensen tanto en líquido pleural como en muestras de tejido pleural (Tovar *et al.*, 2008). Se ha observado que el cultivo sistemático de la biopsia pleural contribuye a aumentar la rentabilidad diagnóstica hasta el 91,5 % para el diagnóstico de tuberculosis (Valdés *et al.*, 1998).

Ante la baja rentabilidad de los estudios microbiológicos en la tuberculosis pleural, se han propuesto métodos alternativos como la técnica de amplificación del ácido nucleico. Esta técnica se basa en la amplificación del ADN de la micobacteria y permite detectarla aunque existan pocos bacilos (Manjunath *et al.*, 1991). En líquido pleural tiene una especificidad 91-97 % y sensibilidad 62-76 %. Su utilidad se centra más en la confirmación de la enfermedad, pero al tratarse de un examen caro y complejo su uso rutinario no está indicado (Pai *et al.*, 2004).

La contrainumoelectroforesis es una técnica que detecta antígenos bacterianos en líquido pleural. Permite la obtención de resultados antes que los cultivos y aplicar un tratamiento antibiótico precoz. Es útil en los derrames producidos por *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* o *Haemophilus*

influenzae. Sin embargo, la mayoría de los derrames paraneumónicos se deben a bacterias anaerobias, para las que no hay disponibles antígenos en el momento actual, por lo que no se recomienda su uso de forma rutinaria (Light, 2013).

1.3.5. Anatomía Patológica

El estudio citológico del líquido pleural es un medio eficiente, barato y mínimamente invasivo para establecer el diagnóstico de enfermedad maligna. Su sensibilidad, que oscila entre el 40 y el 87%, depende de una serie de factores, como el entrenamiento del citólogo, el grado de afectación pleural por la neoplasia y la estirpe tumoral. La rentabilidad de la citología es mayor en los adenocarcinomas que en los mesoteliomas, carcinomas epidermoides, linfomas y sarcomas (Light *et al.*, 2013; Porcel *et al.*, 2014).

En los líquidos con pH o glucosa descendidos, se ha observado una rentabilidad superior del estudio citológico (Sahn *et al.*, 1988; Rodríguez-Panadero *et al.*, 1989). Mientras que una segunda citología puede incrementar el rendimiento diagnóstico en un 7 % (Light *et al.*, 1973), no se recomienda el estudio de más de dos muestras (Hooper *et al.*, 2010). El bloque celular se obtiene al centrifugar 5 ml de líquido y fijarlo en parafina para su procesamiento como si se tratase de una biopsia. Con esta técnica, es posible realizar cortes histológicos y aplicar técnicas de inmunohistoquímica que permitan identificar la estirpe tumoral (Dekker *et al.*, 1978; Shivakumarswamy *et al.*, 2012).

Las entidades que se diagnostican con más frecuencia mediante biopsia pleural son las enfermedades malignas y la tuberculosis. Para el diagnóstico de malignidad, debido a la distribución de las metástasis pleurales, la rentabilidad de la

biopsia pleural cerrada es del 46 %. Sin embargo, cuando se combina con la citología, se puede aumentar el rendimiento diagnóstico hasta un 20 %-30 % (Romero *et al.*, 1996; Falcones *et al.*, 2005).

Más del 95 % de las pleuritis granulomatosas son debidas a tuberculosis. Por tanto, la demostración de granulomas en la pleura parietal, si se descarta sarcoidosis, artritis reumatoide, tularemia o enfermedades por hongos, es diagnóstica de tuberculosis pleural (Light, 2013).

1.3.6. Limitación de los métodos diagnósticos

La aproximación diagnóstica de un derrame pleural, inicialmente basada en la evaluación clínica y radiológica, permite valorar el manejo posterior del estudio del líquido pleural (Villena *et al.*, 2006; Hooper *et al.*, 2010). Por ello, la presencia de síntomas y signos típicos de una determinada enfermedad potencialmente causante de derrame pleural trasudativo podría hacer innecesario cualquier otro estudio adicional. Sin embargo, se ha observado que la valoración clínica antes de la toracocentesis, aunque identifica el 93 % de los exudados, tan sólo clasifica correctamente el 58 % de los trasudados (Romero-Candeira *et al.*, 2002).

Aunque podría sospecharse que el aspecto macroscópico puede orientar la naturaleza del derrame, se ha observado que este dato no es suficiente para la clasificación diagnóstica, debido a que derrames secundarios a insuficiencia cardiaca pueden ser hemáticos, y aunque la obtención de un líquido transparente sería altamente sugestivo de trasudado, la mayor parte de trasudados tienen un aspecto seroso (Villena *et al.*, 2004). Además, la valoración del aspecto de líquido pleural tampoco permite hacer una diferenciación más exacta de los trasudados

que la conseguida por la impresión clínica previa a la toracocentesis (Romero-Candeira *et al.*, 2002).

Por otro lado, es conocido que las técnicas de imagen pueden aportar información de utilidad en el estudio del derrame pleural. Sin embargo, su valor diagnóstico es limitado. A pesar de la elevada sensibilidad de la TC para detectar derrame pleural, no lo es tanto en su capacidad para caracterizarlo. La TC torácica no ha superado a los criterios bioquímicos en la diferenciación de trasudados y exudados (Aquino *et al.*, 1994, Arenas-Jiménez *et al.*, 2000), y aunque puede ayudar a diferenciar entre derrames malignos y benignos, la presencia de engrosamientos nodulares pleurales sugestivos de malignidad, sólo se encuentra en menos del 20% de los derrames pleurales malignos (Arenas-Jiménez *et al.*, 2000).

La PET o la RNM, tampoco han superado a los criterios de Light en la separación entre exudados y trasudados, y conllevan un mayor gasto (Duysinx *et al.*, 2006; Baysal *et al.*, 2004). En el estudio del derrame pleural maligno, la PET presenta limitaciones al presentar una alta tasa de falsos positivos como en los casos de pleuritis urémica, pleurodesis previas y en las infecciones del espacio pleural. Además, puede presentar falsos negativos en el tumor fibroso de crecimiento lento, en el linfoma y en las metástasis del cáncer de próstata (Porcel *et al.*, 2015).

Aunque la toracocentesis puede ser definitivamente diagnóstica en los casos de derrame pleural maligno, empiema y tuberculosis, la rentabilidad de los estudios citohistológico y microbiológico es limitada. Los pacientes con neumonía y derrame pleural requieren una toracocentesis para valorar si el líquido está infectado. La obtención de material purulento se considera diagnóstico de empiema. Sin embargo, la tinción de Gram y los cultivos son negativos en aproximadamente un

40 % de los casos (Maskell *et al.*, 2005). En estos casos, el pH y los parámetros bioquímicos se postulan como un método diagnóstico fiable y también, aportan información sobre la evolución del derrame paraneumónico y la decisión o no de la necesidad de un drenaje pleural (Heffner *et al.*, 2009; Ferreiro *et al.*, 2015).

Establecer el diagnóstico de un derrame pleural maligno es rápido y sencillo si se demuestran células neoplásicas en líquido pleural o muestras de biopsia pleural. Sin embargo, la sensibilidad de la citología oscila entre el 40 y 87 % de los derrames pleurales malignos (Hooper *et al.*, 2010) y su rentabilidad está condicionada por el grado de afectación pleural por la neoplasia, la experiencia del citólogo y la presencia de otros factores como la estirpe tumoral, siendo menos rentable en los casos de mesotelioma, linfoma y carcinoma epidermoide de pulmón (Light, 2013). La rentabilidad de la biopsia pleural ciega no es superior a la citología, y alcanza una tasa de falsos negativos del 52 %, por lo que un resultado negativo no excluye la existencia de estos procesos (Vonhoff *et al.*, 1975). Además, si la citología del líquido es negativa, la biopsia pleural generalmente no es diagnóstica. En una serie de 281 pacientes con derrame pleural maligno, la biopsia pleural fue positiva en sólo 20 (17 %) de los 119 pacientes que presentaban una citología negativa (Prakash *et al.*, 1985). Y aunque la toracoscopia es el procedimiento diagnóstico de elección para aquellos derrames pleurales de causa inexplicada, se estima que hasta en un 15-20 % de los casos no se establece la causa de la causa del derrame pleural (Harris *et al.*, 1995; Light, 2002; Valsecchi *et al.*, 2016).

Por tanto, los métodos diagnósticos de certeza presentan limitaciones y en ocasiones se necesita un tiempo de espera prolongado para obtener sus resultados, como es el caso de los cultivos. Por tanto, es necesaria la determinación de parámetros bioquímicos, ya que estudios como la citología y microbiología tienen una rentabilidad limitada en el estudio de derrame pleural.

1.4. ESTUDIO BIOQUÍMICO DEL LÍQUIDO PLEURAL

1.4.1. Generalidades

El líquido pleural es un ultrafiltrado del plasma en cuanto a su composición. Las dos hojas pleurales actúan como membranas semipermeables, de tal forma que la concentración de pequeñas moléculas, como la glucosa, es similar en el líquido pleural y plasma, mientras que la concentración de macromoléculas, como la albúmina, es menor que en el plasma.

Aunque el recuento leucocitario no tiene valor diagnóstico, el recuento celular total y diferencial puede proporcionar información de utilidad en el diagnóstico diferencial de los exudados pleurales. Un factor que influye en el tipo de población celular es el tiempo de evolución del derrame. El predominio de polimorfonucleares indica un proceso agudo, mientras que un predominio de células mononucleares suele observarse en un proceso pleural crónico. Un derrame con predominio de linfocitos indica una mayor posibilidad de un origen maligno o tuberculoso (Sahn, 2008).

El análisis bioquímico del líquido pleural suele incluir, además de las proteínas y LDH, la concentración de glucosa, pH y adenosín desaminasa. La determinación de los parámetros básicos permite una primera aproximación al diagnóstico etiológico y permite la distinción inicial entre trasudados y exudados. Como hemos visto, esta distinción ayuda a conocer el mecanismo fisiopatológico por el que se produce el derrame pleural, y a acotar su diagnóstico diferencial. En consecuencia, si se trata de un exudado pleural se requerirán pruebas diagnósticas adicionales para establecer la causa local de la enfermedad, en cambio, si se trata de un trasudado, generalmente no precisa otro tipo de análisis, siendo la insuficiencia cardíaca congestiva la entidad más frecuente.

1.4.2. Parámetros bioquímicos básicos en líquido pleural

pH

El pH se debe recoger en condiciones de anaerobiosis y determinar con un analizador de gases (Cheng *et al.*, 1998). En condiciones normales, el pH del líquido pleural es ligeramente alcalino respecto al plasma y está influenciado por el pH arterial (Light *et al.*, 1973). Para los trasudados su valor oscila entre 7,45 y 7,55, a excepción del urinotórax (García-Pachón *et al.*, 2004). En cambio, la mayoría de los exudados tienen un pH entre 7,30 y 7,45 (Villena *et al.*, 2006). Se encuentra descendido en el derrame paraneumónico complicado y también en los derrames malignos, las pleuritis lúpicas o reumatoide y el derrame tuberculoso (Sahn *et al.*, 1988).

La determinación de pH pleural resulta de gran utilidad en los derrames paraneumónicos y malignos, donde presenta unas implicaciones pronósticas y terapéuticas. Un valor de pH por debajo de 7,20 en un derrame infeccioso, indica la necesidad de colocar un drenaje torácico (Colice *et al.*, 2000; Porcel *et al.*, 2016). En los derrames neoplásicos, un pH bajo se correlaciona con una mayor carga tumoral en el espacio pleural y una mayor rentabilidad de la citología. Un pH por debajo de 7,20 indica un fracaso en la pleurodesis cercano al 70 % (Rodríguez- Panadero *et al.*, 1989; Sánchez-Armengol *et al.*, 1993) y peor supervivencia (Sahn *et al.*, 1988).

Exceptuando los pacientes diabéticos con hiperglucemia mantenida, los valores de pH se correlacionan estrechamente con los de glucemia en el líquido pleural, con la excepción del urinotórax (García-Pachón *et al.*, 2004). Además, se ha observado que el uso de anestesia local puede hacer descender falsamente el valor del pH e inducir a errores en el manejo de determinados derrames (Jiménez-Castro *et al.*, 1999; Rahman *et al.*, 2008).

Glucosa

En ausencia de afectación pleural, la glucosa difunde a través de la membrana pleural y su concentración se relaciona con los valores sanguíneos. La concentración de glucosa en líquido pleural puede disminuir por un consumo excesivo por parte del metabolismo celular o bacteriano, o por bloqueo del transporte desde la sangre al espacio pleural (Good *et al.*, 1985).

Su determinación es útil en el diagnóstico diferencial de los exudados pleurales. Una concentración por debajo de 60 mg/dL se puede encontrar en los derrames paraneumónicos complicados (Heffner *et al.*, 1995), derrame pleural maligno (Rodríguez-Panadero *et al.*, 1989), pleuritis reumatoide (Sahn *et al.*, 1980) o tuberculosas (Light, 2013). Los bajos niveles de glucosa encontrados en los derrames pleurales secundarios a artritis reumatoide se han atribuido al paso alterado de glucosa al líquido pleural y a la eliminación deficitaria de productos del metabolismo glucosado (Sahn *et al.*, 1980).

Al igual que el pH, los valores descendidos de glucosa (< 60 mg/dL) tienen importancia pronóstica y terapéutica. En los derrames metaneumónicos, es un indicador útil para establecer la necesidad de un drenaje torácico (Heffner *et al.*, 1995; Colice *et al.*, 2000). En los derrames pleurales malignos, varios estudios han demostrado que unas cifras bajas de glucosa se correlacionan con mayor rendimiento diagnóstico de la citología y peor pronóstico al traducir una mayor extensión de las lesiones pleurales (Rodríguez-Panadero *et al.*, 1989; Sánchez-Armengol *et al.*, 1993).

Proteínas

Los valores de las proteínas son generalmente superiores en los exudados pleurales que en los trasudados y su relación con las proteínas plasmáticas es uno de los criterios de Light para la diferenciación entre trasudados y exudados (Light *et al.*, 1972). Sin embargo, no son útiles para separar entre los diferentes tipos de exudados pleurales. El espectro electroforético es similar al suero, a excepción de la albúmina, que es algo mayor en el líquido pleural.

Durante la diuresis, la presión oncótica de la sangre aumenta y se produce el paso de agua desde el espacio extravascular a la sangre, esta situación conlleva a un aumento de la concentración de las proteínas en el líquido pleural (Broaddus *et al.*, 2001).

LDH

La LDH es un marcador inespecífico del grado de inflamación pleural y al igual que las proteínas, su valor es de utilidad en la diferenciación entre exudados y trasudados (Light *et al.*, 1972). Su determinación, junto al pH y glucosa, aporta información para diferenciar los derrames infecciosos de evolución complicada. De tal forma que los niveles elevados de LDH se han relacionado con la formación de adherencias pleurales, y es un parámetro útil para seguir la evolución y pronóstico del derrame de origen infeccioso (Bharnagar *et al.*, 2013). Además, en el derrame pleural maligno, cifras muy elevadas se relacionan con una gran infiltración metastásica, peor pronóstico y pobre respuesta a la pleurodesis (Martínez-Moragón *et al.*, 1998).

Su determinación se recomienda en cada toracocentesis de los derrames pleurales de etiología no aclarada. Si se aprecia un aumento de los niveles de LDH,

indica un empeoramiento del grado de inflamación pleural y se debería buscar la etiología del derrame de forma más agresiva (Light, 2013).

A este parámetro se le dedicará más adelante un apartado específico.

Colesterol

Clásicamente se ha sugerido que la presencia de colesterol en el espacio pleural se debía a la degeneración celular fundamentalmente de leucocitos y hematíes, pero su origen parece derivar de las lipoproteínas séricas más que de la lisis celular (Hillerdal, 1997).

La determinación de colesterol además de ser un parámetro que puede aportar información de utilidad para la diferenciación entre trasudados y exudados (Hamm *et al.*, 1987), ayuda junto con los triglicéridos para diferenciar los derrames pleurales de larga evolución pseudoquilosos de los quilotórax. El pseudoquilotórax clásicamente se ha caracterizado por tener una concentración de colesterol superior a 200 mg/dL. No obstante, una ratio de colesterol/triglicéridos superior a uno y la presencia de cristales de colesterol presentan una mayor sensibilidad diagnóstica (Lama *et al.*, 2016).

Adenosín desaminasa

La enzima adenosín desaminasa (ADA) es una enzima que cataliza la adenosina y la desoxiadenosina en inosina y desoxiinosina con liberación de amonio y juega un papel relevante en la proliferación de los linfocitos T. Su determinación en líquido pleural se ha mostrado muy útil en el diagnóstico de la pleuritis tuberculosa en países donde la prevalencia de tuberculosis es elevada, pero su valor

parece limitado en aquellos con prevalencia baja (Valdés *et al.*, 1995; Galborini, 2005). Además, también puede estar elevada en otras entidades como empiemas (Valdés *et al.*, 1993), la artritis reumatoide (Ocaña *et al.*, 1988), y ocasionalmente, en derrames malignos (Barbé *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2001; Jiménez Castro *et al.*, 2003).

Se determina de forma rutinaria en países con una prevalencia de tuberculosis alta/moderada. En los países con una elevada prevalencia, la rentabilidad del ADA es tan elevada que podría prescindirse de la biopsia pleural para el diagnóstico de tuberculosis pleural (Valdés *et al.*, 1995). Sin embargo, se trata de un biomarcador de la inflamación, por lo que no sustituye al cultivo ni aporta información de la sensibilidad de los fármacos antituberculosos.

Diferentes autores han utilizado varios puntos de corte que oscilan entre 30 y 70 U/L para el diagnóstico de tuberculosis pleural. Por tanto, su sensibilidad y especificidad varían en función del punto de corte que se establezca. Liang *et al* (2008), en un metanálisis de 63 estudios que incluyó más de 8000 derrames pleurales, obtuvieron una sensibilidad media de 92 %, especificidad de 90 %, las razones de probabilidad positivas y negativas de 9 y 0,10 respectivamente. La especificidad de la ADA supera al 95 % si se considera sólo los exudados linfocitarios (Porcel *et al.*, 2002; Jiménez Castro *et al.*, 2003). Valores por encima de 70 UI/L, en pacientes que no tienen un empiema o artritis reumatoide, son altamente sugestivos de pleuritis tuberculosa, y valores por debajo de 40 UI/L prácticamente excluirían este diagnóstico (Light, 2013).

Además, se ha observado que los niveles de ADA también se elevan en los derrames tuberculosos con bajo número de células CD4+, por lo que es útil en

pacientes con infección retroviral independientemente del nivel de CD4 (Baba *et al.*, 2008) y en trasplantados renales (Chung *et al.*, 2004).

1.4.3. Estudio bioquímico para la diferenciación entre trasudado y exudado

La separación entre trasudados y exudados se considera el paso inicial en el estudio de cualquier derrame pleural de causa desconocida (Bartter *et al.*, 1994). Esta distinción, aunque no indica la enfermedad responsable, permite un primer acercamiento a la etiología del derrame y orientar los estudios posteriores. Si se trata de un exudado pleural, se necesitarán pruebas diagnósticas adicionales para establecer la causa local de la enfermedad. Sin embargo, si se trata de un trasudado, se ha de tratar la causa antes de proceder a estudios del derrame.

Los criterios bioquímicos han mostrado una alta especificidad y sensibilidad para diferenciar trasudados de exudados y son significativamente superiores a la presunción clínica aislada para la separación entre exudados y trasudados (Romero *et al.*, 2002). Se han propuestos varios parámetros bioquímicos para la diferenciación entre trasudados y exudados, y con diferentes puntos de corte (Tabla 1.4.3.1.).

Durante muchos años, una concentración de proteínas mayor de 3 g/dL se utilizó para separar trasudados de exudados, con el principal inconveniente de que dejaba sin clasificar un 10 % de los derrames (Leuallen *et al.*, 1955).

Parámetro	Puntos de corte	Referencia
En líquido pleural		
Proteínas	< 3 g/dL	Leuallen <i>et al.</i> , 1955
LDH	< 2/3 LSN LDH sérica	Light <i>et al.</i> , 1972
Colesterol	< 45 mg/dL < 55 mg/dL < 60 mg/dL	Costas <i>et al.</i> , 1995 Valdés <i>et al.</i> , 1991 Romero <i>et al.</i> , 1993; Hamm <i>et al.</i> , 1987
Colinesterasa	< 1390 U/L < 1/10 LSN colinesterasa sérica < 1600 U/L	Romero <i>et al.</i> , 2000 García-Pachón <i>et al.</i> , 1996 Porcel <i>et al.</i> , 2001
Cociente LP/suero		
Proteínas	< 0,5 < 0,6	Light <i>et al.</i> , 1972 Romero <i>et al.</i> , 1993
LDH	< 0,6 < 0,9	Light <i>et al.</i> , 1972 Romero <i>et al.</i> , 1993
Colesterol	< 0,3	Valdés <i>et al.</i> , 1991; Romero <i>et al.</i> , 1993
Colinesterasa	< 0,23 < 0,27	García-Pachón <i>et al.</i> , 1996 Romero <i>et al.</i> , 2000
Bilirrubina	< 0,6	Meisel <i>et al.</i> , 1990
Gradiente suero-LP		
Albúmina	> 1,2	Roth <i>et al.</i> , 1990
Proteínas	> 3,1	Romero-Candeira <i>et al.</i> , 2001

Tabla 1.4.3.1. Principales parámetros bioquímicos para clasificar trasudados

En 1972, Light *et al.* demostraron que el uso combinado del valor de las proteínas y de la LDH en suero y en líquido pleural lograba una clasificación más precisa de los derrames pleurales. La combinación de los parámetros propuestos

por Light y col. (Light *et al.*, 1972), definen un exudado si se cumple alguno de los siguientes criterios:

- Relación proteínas líquido pleural/suero mayor de 0,5.
- Relación LDH líquido pleural/suero mayor de 0,6.
- LDH del líquido pleural superior a los 2/3 del límite superior de la normalidad de la LDH en suero.

Estos criterios, son los de uso más extendido con una sensibilidad para exudados cercana al 100 %. Sin embargo, su principal inconveniente es su especificidad menor del 70 al 90 %, que hace que del 15 al 30 % de los trasudados sean considerados como exudados (Romero *et al.*, 1993; Romero *et al.*, 2000; Romero *et al.*, 2002), especialmente si el paciente está recibiendo tratamiento diurético (Romero-Candeira *et al.*, 2002). Este error puede conllevar el riesgo de que pacientes con trasudados sean sometidos a intervenciones invasivas, y que se pueda demorar un adecuado tratamiento de la enfermedad responsable.

A lo largo de los años se han propuesto otros parámetros, con diferentes puntos de corte, que permitan diferenciar mejor trasudados de exudados. La determinación del colesterol en líquido pleural y de su cociente entre líquido pleural y suero, han logrado buenos resultados, aunque con diferentes puntos de corte. En 1987, Hamm y col. estudiaron la utilidad de la determinación de colesterol en líquido pleural, estableciendo un punto de corte en 60 mg/dL para el diagnóstico de exudado, con una especificidad del 100 % y una sensibilidad del 90 %. (Hamm *et al.*, 1987). Posteriormente, Valdés y col obtuvieron unos resultados similares, estableciendo un valor de 55 mg/dL con una especificidad del 100 % y sensibilidad del 91 % para el diagnóstico de exudados. Utilizando el cociente de colesterol entre líquido pleural y suero con un valor por encima de $\geq 0,3$ para exudados obtuvieron

unas sensibilidad del 93 % y una especificidad del 88 % (Valdés *et al.*, 1991). Sin embargo, no ha mostrado mejores resultados que los criterios bioquímicos clásicos (Shen *et al.*, 2014).

En 1978, Cabrer y col analizaron la actividad de la colinesterasa en el líquido pleural y obtuvieron valores más elevados en derrames neoplásicos, tuberculosos y empiemas que en los derrames por insuficiencia cardiaca (Cabrer *et al.*, 1978). Posteriormente, García-Pachón y col (1996) estudiaron el valor de la colinesterasa y de su cociente entre el líquido pleural y suero para separar exudados de trasudados. Encontraron que el cociente de colinesterasa entre el líquido pleural y suero, era un parámetro útil con una eficiencia diagnóstica cercana al 99 %. Además, aportaba información para la diferenciación de los exudados pleurales (García-Pachón *et al.*, 1997). Sin embargo, estos excelentes resultados no se han podido reproducir en estudios posteriores.

El hecho de que la mayoría de los falsos exudados se produce en pacientes sometidos a tratamiento diurético, ha dado lugar a la búsqueda de criterios alternativos para ser aplicados en este grupo. En pacientes con tratamiento diurético efectivo, el hallazgo de un gradiente de albúmina entre el suero y el líquido pleural superior a 1,2 (Burgess *et al.*, 1995; Bielsa *et al.*, 2012), o de un gradiente de proteínas suero-líquido pleural superior a 3,1 g/dL (Romero-Candeira *et al.*, 2001), apoyaría la naturaleza trasudativa del derrame. Por otro lado, estudios recientes han mostrado que unas concentraciones de profactor natriurético cerebral en líquido pleural superior a 1500 pg/mL apoyaría la naturaleza cardiaca del derrame pleural. En cambio, al presentar una buena correlación con los valores en suero, su determinación rutinaria en pleura no se recomienda (Liao *et al.*, 2008; Porcel, 2011).

La combinación de parámetros puede ser útiles para diferenciar trasudados de exudados. Varios trabajos señalan que la combinación de la medida de LDH y colesterol en líquido pleural presenta una rentabilidad similar a los criterios de Light para la separación de exudados y trasudados (Romero *et al.*, 1993; Costa *et al.*, 1995; Heffner *et al.*, 1997; Jiménez Castro *et al.*, 2002). Una LDH en líquido pleural superior a dos tercios del límite superior de la normalidad sérica y un colesterol mayor de 60 mg/dL en líquido pleural podría suplir a los criterios de Light si se quiere evitar una extracción sanguínea (Costa *et al.*, 1995). Del mismo modo, Jiménez y col encuentran una rentabilidad similar a los criterios de Light para valores de colesterol por encima de 47 mg/dL y LDH mayor de 222 U/L en líquido pleural (Jiménez *et al.*, 2002). De esta forma sería innecesaria la realización de una extracción sanguínea simultánea y simplificaría el proceso.

A pesar de que a lo largo de los años, se han estudiado diferentes parámetros bioquímicos estudiados con el objetivo de incrementar la rentabilidad diagnóstica, no se ha demostrado su superioridad, y los criterios propuestos por Light, con las limitaciones que presentan, siguen resultando los más exactos y económicos. Por lo que sigue siendo necesario investigar otras opciones con este fin.

1.4.4. Estudio bioquímico en los derrames infecciosos

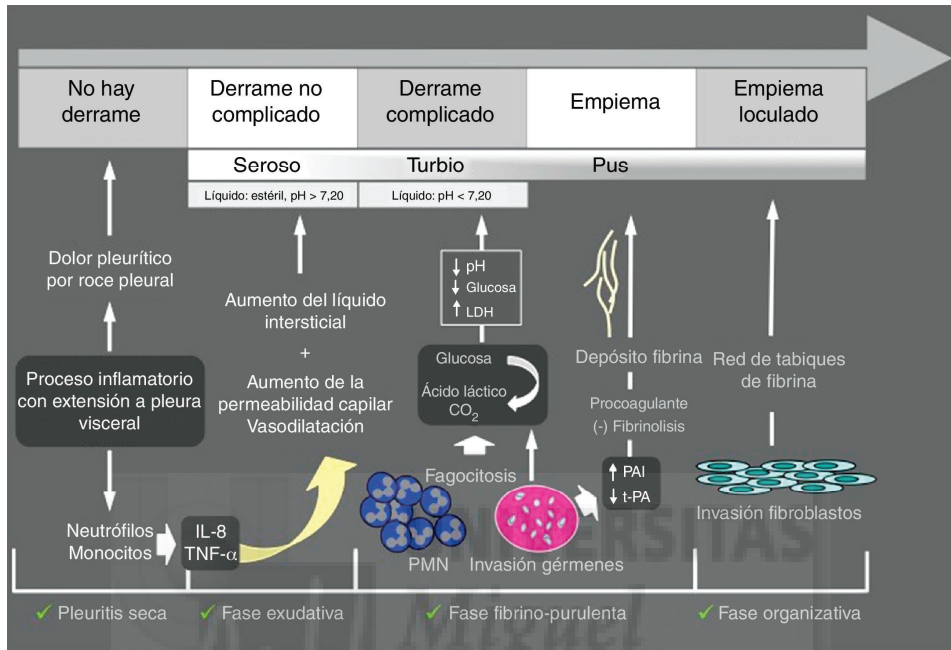
Derrame pleural paraneumónico y empiema

El derrame pleural paraneumónico (DPP) es el que se asocia con una neumonía bacteriana, absceso o bronquiectasias sobreinfectadas (Light *et al.*, 1973). Entre un 20 y 57 % de las neumonías bacterianas se acompañan de derrame pleural paraneumónico y alrededor de un 40 % de estos, son derrames pleurales

paraneumónicos complicados o empiemas (Chalmers *et al.*, 2009). La presencia de microorganismos, la turbidez o el olor pútrido confirman el diagnóstico de derrame paraneumónico, considerándose empiema si se obtiene pus.

Independientemente de su etiología, se identifican tres fases en su evolución: fase aguda o exudativa, fibrinopurulenta o de transición y fase organizativa o crónica. En la fase exudativa se acumula líquido pleural estéril relacionado con el aumento de la permeabilidad capilar. El líquido se caracteriza por ser un exudado de predominio polimorfonuclear, con concentraciones normales de LDH y glucosa y sin alteraciones del pH. En la fase fibrinopurulenta, la invasión bacteriana del espacio pleural induce un daño endotelial que conlleva la disminución de la respuesta fibrinolítica. El líquido pleural se hace más denso, debido al incremento de polimorfonucleares en respuesta a la proliferación de microorganismos y al depósito de fibrina. Se observa un aumento del número de leucocitos polimorfonucleares en el líquido pleural, un descenso de los niveles de glucosa, incremento de la LDH generalmente por encima de 1000 UI/l y disminución del pH. La fase organizativa se produce una activación y migración de fibroblastos a la membrana que se está desarrollando y que originan la formación de una corteza pleural rígida. Estas tres fases suelen suceder de forma progresiva (Figura 1.4.4.1). El aspecto, análisis y cultivo del líquido pleural pueden variar en cada una de las fases evolutivas del DPP (Sahn *et al.*, 1983; Ferreiro *et al.*, 2015).

Fig 1.4.4.1. Fases evolutivas del derrame pleural paraneumónico



El líquido pleural es un exudado con predominio de leucocitos polimorfonucleares en el que la LDH, la glucosa y el pH, son los parámetros utilizados para valorar la gravedad y predecir el curso de un derrame pleural paraneumónico, para detectar lo antes posible, un DPP complicado o empiema. En su evolución, se ha observado que el pH es el mejor indicador al descender antes que la glucosa (Sahn *et al.*, 1979). En un metanálisis, Heffner concluyó que el pH era el mejor parámetro para diferenciar derrames complicados y no complicados estableciendo como punto de corte un pH de 7,20 (Heffner *et al.*, 1995). Recientemente, se ha observado que un pH \leq 7,15 junto con el tamaño del derrame, fueron los mejores predictores de la necesidad de un drenaje pleural (Porcel *et al.*, 2016). Sin embargo, existen situaciones en las que el pH no refleja la presencia de un derrame complicado. Esta situación se debe a la heterogeneidad de las características bioquímicas que pueden presentar los derrames pleurales

tabicados. Otra circunstancia es la infección causada por *Proteus spp*, ya que estos agentes pueden secretar enzimas capaces de provocar una alcalinización del pH local (Pine *et al.*, 1983). Una glucosa < 60 mg/dL y una LDH > 1000 UI/L, aunque no mejoran la rentabilidad diagnóstica, pueden ser de utilidad diagnóstica y pronóstica, sobre todo cuando no se puede determinar el pH (Davies *et al.*, 2010).

Tabla 1.4.4.1. Clasificación de Light de los derrames pleurales paraneumónicos y empiemas

Clase 1 Derrame Paraneumónico No significativo	Pequeño o < 10 mm de grosor en decúbito No precisa toracocentesis	Antibioterapia
Clase 2 Derrame Paraneumónico Típico	>10 mm de grosor o glucosa > 40 mg/dL y pH > 7,20 Tinción de Gram y cultivos negativos	Antibioterapia
Clase 3 Derrame Paraneumónico Complicado Borderline	pH 7,00-7,20 y/o LDH > 1000 UI/L y glucosa > 40 mg/dL Tinción de Gram y cultivos negativos	Antibioterapia Toracocentesis seriadas
Clase 4 Derrame Paraneumónico Complicado Simple	pH < 7,00 y/o glucosa < 40 mg/dL Tinción de Gram y cultivos positivos No loculaciones	Antibioterapia Drenaje
Clase 5 Derrame Paraneumónico Complicado Complejo	pH < 7,00 Tinción de Gram o cultivo positivos o loculado	Drenaje Fibrinolíticos
Clase 6 Empiema Simple	Presencia franca de pus Loculación única o líquido libre	Drenaje ± Decorticación
Clase 7 Empiema Complejo	Presencia franca de pus Múltiples loculaciones	Drenaje ± Fibrinolíticos Toracoscopia. Decorticación

Basándose en estas variables, Light (Light, 2013) ha establecido siete tipos de derrames paraneumónicos, con una clasificación útil para su manejo posterior (Tabla 1.4.4.1). De esta forma, si el líquido no es purulento, serán necesarios más estudios para detectar lo antes posible un DPP complicado y establecer el

pronóstico. En cambio, la presencia de pus será indicativa de drenaje pleural sin ser necesarios más estudios.

La proteína C reactiva (PCR) se ha utilizado para diferenciar DPP de los exudados no paraneumónicos. Su especificidad aumenta si sus valores se asocian a un predominio polimorfonuclear. Además, si un valor de PCR > 100 mg/dL en líquido pleural se acompaña de un pH < 7,20 o de una glucosa < 60 mg/dL en líquido pleural, puede incrementar la capacidad para establecer el diagnóstico de derrame pleural complicado y la necesidad de un drenaje torácico (Porcel *et al.*, 2016).

La adenosina desaminasa puede estar elevada en los DPP y empiemas, pero a diferencia del derrame pleural tuberculoso, en el que se eleva la isoenzima ADA2, en los DPP y empiemas la isoenzima encontrada es ADA1 (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2000). Sin embargo, su determinación rutinaria no está indicada.

Derrame pleural tuberculoso

El derrame pleural tuberculoso es invariablemente un exudado con valores de proteínas por encima de 5 g/dL (Light 2013; Ferreiro *et al.*, 2014). Aunque en el 90 % de los casos suele existir un predominio linfocítico, en los primeros días puede ser polimorfonuclear. Contiene menos de un 10 % de eosinófilos y típicamente presenta escasas células mesoteliales. Los valores de glucosa del líquido, aunque pueden descender, son similares a los del suero. El pH generalmente es superior a 7,30 y los valores de LDH son superiores a los del suero (Light, 2013).

Como el rendimiento de los estudios microbiológicos en la tuberculosis pleural es bajo, se han utilizado biomarcadores en el líquido pleural como la enzima ADA o el interferón-gamma. La enzima ADA juega un papel relevante en la proliferación y diferenciación de los linfocitos T. El nivel de corte más aceptado es de 35 UI, y el rendimiento mejora cuando se combina con la edad y con una proporción linfocitos/neutrófilos en líquido pleural superior a 70 (Villena *et al.*, 2014). La ADA tiene 2 isoenzimas: ADA1 y ADA2. La primera se encuentra en todas las células, mientras que la segunda se halla en los monocitos/macrófagos y se eleva cuando se estimulan por microorganismos vivos en su interior (Gakis *et al.*, 1989). Se ha observado que en los derrames pleurales tuberculosos existe un predominio de la ADA2, de tal forma que la determinación de las isoenzimas de la ADA permitiría incrementar su rendimiento diagnóstico. Mientras la ADA1, es ubicua y puede elevarse en otros tipos de derrames pleurales, la ADA2 es la responsable de los valores elevados del ADA en el derrame pleural tuberculoso. (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2000). Aunque valores de ADA1/ADA menores de 0,42 podría incrementar ligeramente la sensibilidad y especificidad de la ADA en el diagnóstico de la tuberculosis pleural, su uso no está justificado en la mayor parte de los casos (Valdés *et al.*, 1996; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2000).

El interferón-gamma (IFN- γ) es una citoquina liberada por los linfocitos T-CD4 que aumenta la actividad micobactericida de los macrófagos y es posible su determinación en el líquido pleural (Ferreiro *et al.*, 2014). Al igual que la ADA, no existe un punto de corte universal y puede presentar falsos positivos en los derrames malignos y empiemas (Villena *et al.*, 2003). Sin embargo, en un metanálisis de 7 estudios, la sensibilidad y especificidad fue de 75 % y 82 % (Zhou *et al.*, 2011), estos resultados, junto con su elevado coste, no justifican su uso en la práctica clínica habitual.

La lisozima es una enzima presente en granulocitos y macrófagos activados. Sus niveles se encuentran elevados la tuberculosis pleural, pero también en derrames malignos y empiemas, por lo que su especificidad es baja. Además, su rentabilidad es inferior a la de la ADA y el IFN- γ (Valdés *et al.*, 1993).

Se ha observado que la concentración de la proteína C reactiva está elevada en los derrames pleurales tuberculosos (Chierakul *et al.*, 2004). En nuestra experiencia, la determinación de la PCR en líquido pleural es útil en el diagnóstico de los derrames pleurales linfocitarios. Observamos que el nivel de PCR fue significativamente mayor en la pleuritis tuberculosa (54 ± 24 mg/L) que en los derrames linfocíticos de otro origen (21 ± 16 mg/L). Por tanto, niveles de PCR \geq de 50 mg/L, tiene una especificidad de 95 % para el diagnóstico de tuberculosis pleural, mientras que valores inferiores a 30 mg/L tiene una sensibilidad de 95 % para la exclusión de la enfermedad (García-Pachón *et al.*, 2005).

1.4.5. Estudio bioquímico en los derrames malignos

En más de un 95 % de los casos, el derrame pleural maligno suele ser un exudado con predominio linfocitario (80 %), y aproximadamente el 95 % tienen cifras de ADA menor de 35 U/L (Villena *et al.*, 2014). En ocasiones, el derrame maligno puede presentar características de trasudado, como en algunos casos de linfangitis carcinomatosa, la afectación pleural por linfoma B de bajo grado de malignidad y en casos de atelectasia por neoplasia bronquial proximal (Fernández *et al.*, 2000).

En un 15 %-30 % de los derrames malignos, los valores de glucosa se encuentran por debajo de 60 mg/dL (Rodríguez-Panadero *et al.*, 1989; Light, 2013).

La disminución de la glucosa se ha relacionado con una mayor afectación tumoral en el espacio pleural al dificultar la transferencia de glucosa de la sangre al líquido pleural (Good *et al.*, 1985). En estos casos, se ha observado que la citología y la biopsia pleural presentan una mayor rentabilidad, y se ha relacionado con un peor pronóstico (Rodríguez-Panadero *et al.*, 1989; Light, 2013).

Aproximadamente, un tercio de los derrames malignos tienen un pH menor de 7,30 (Light *et al.*, 1973; Sahn *et al.*, 1988; Rodríguez-Panadero *et al.*, 1989). En estos casos, el descenso en los valores de pH es consecuencia de la combinación del aumento en la producción de ácido en el líquido pleural, y del bloqueo de la salida de dióxido de carbono desde el espacio pleural (Good *et al.*, 1985). Del mismo modo que la glucosa, las cifras descendidas de pH en el líquido, se han relacionado con un mayor rendimiento de la citología, (Sahn *et al.*, 1988; Light, 2013), peor supervivencia (Sahn *et al.*, 1988) y peor respuesta a la pleurodesis (Rodríguez-Panadero *et al.*, 1989; Sánchez-Armengol *et al.*, 1993). Sin embargo, otros autores no han podido demostrar el valor pronóstico del pH de forma aislada, por lo que deberían considerarse otros factores y el estado general del paciente (Martínez-Moragón *et al.*, 1998).

Se ha observado que la elevación de las concentraciones de amilasa en líquido pleural de tipo salival, en ausencia rotura esofágica, es sugestivo de malignidad. Sobre todo en el adenocarcinoma de pulmón. Sin embargo, este hallazgo tan sólo se ha encontrado en el 10 %-14 % de los derrames malignos, por lo que su uso rutinario no está justificado (Light *et al.*, 1973, Villena *et al.*, 2002).

La determinación de la PCR en el líquido pleural de los exudados pleurales puede ser de utilidad para identificar derrames de origen maligno. Se ha observado que valores inferiores a 20 mg/L sugieren un origen maligno, mientras que cifras

superiores a 45 mg/L, hacen muy improbable este diagnóstico (García-Pachón *et al.*, 2002).

En un intento de incrementar la rentabilidad del líquido pleural para diagnosticar malignidad, se han estudiado el valor de diferentes marcadores tumorales biológicos. El antígeno carcinoembrionario (CEA), es el marcador más común y ha sido estudiado extensamente (Romero *et al.*, 1996; García-Pachón *et al.*, 1997; Liang *et al.*, 2008). Se trata de una glucoproteína oncofetal asociada a las neoplasias epiteliales, especialmente pulmón, aparato digestivo y mama. Aproximadamente un 30 - 40 % de pacientes con derrame pleural maligno tienen valores de CEA en líquido pleural por encima de 10 ng/mL. La sensibilidad del CEA para detectar malignidad fue del 57 %, y la especificidad del 99 % (Romero *et al.*, 1996). Sin embargo, la obtención de CEA elevado en líquido pleural resulta controvertida, puesto que se han encontrado valores de CEA elevados en un 9 % de derrames no malignos, principalmente en empiemas y derrames pleurales paraneumónicos complicados (García-Pachón *et al.*, 1997).

Debido a la baja sensibilidad (25 %-55 %) de los marcadores tumores en el diagnóstico del derrame pleural, no se recomienda su uso rutinario de forma individual (Hooper *et al.*, 2010; Light, 2013; Villena *et al.*, 2014). En cambio, si se combinan dos o más de ellos, se ha observado que aumenta la sensibilidad y la rentabilidad diagnóstica frente a su uso individual, siempre que se interpreten con los hallazgos clínicos y con los estudios convencionales (Liang *et al.*, 2008). Cuando se aplica un panel de marcadores que incluye la determinación del CEA, CA 125, CA 15-3 y CYFRA 21-1 en líquido pleural, se obtiene sensibilidad del 54 %. Sin embargo, cuando se combina con la citología, aumenta la sensibilidad al 69 % (Porcel *et al.*, 2004). Recientemente, los mismos autores, aplican un modelo predictivo que incluye 120 biomarcadores para la identificación de derrames malignos (Porcel *et*

al., 2016), encontrando que la combinación de 4 marcadores que incluyen metaloproteinasa-9, catepsina-B, PCR y condroitín sulfato, tiene una sensibilidad y especificidad de 85 % y 100 % para diferenciar derrames malignos y tuberculosos. Mientras que la combinación de CA 19-9, CA 15-3, y calicreina-12, se obtiene una sensibilidad de 65 % y especificidad del 100 % para diferenciación entre el adenocarcinoma y mesotelioma.

Por tanto, aunque los marcadores tumorales no tienen un valor diagnóstico definitivo y no se recomienda su uso rutinario en el estudio del líquido pleural, podrían ser de utilidad para seleccionar a aquellos casos de etiología desconocida, especialmente si se plantean técnicas invasivas, que podrían estar indicadas cuando la citología es negativa y los marcadores claramente positivos.

1.5. LACTATO DESHIDROGENASA EN LIQUIDO PLEURAL

1.5.1. LDH. Conceptos generales

Lactato deshidrogenasa (LD, LDH; (S)-lactato-NAD⁺, EC 1.1.1.27) es una enzima celular citoplasmática de la vía glucolítica que cataliza una reacción redox reversible, en la que el piruvato es reducido a lactato gracias a la oxidación de NADH a NAD⁺ (Figura 1.5.1.1). Se trata de una enzima importante en el metabolismo anaerobio de la glucosa para la regeneración del NAD⁺. El equilibrio de la reacción es dependiente del pH. Con pH alcalino se favorece la conversión de lactato a piruvato y el pH neutro favorece la reacción inversa (Canalias, 1996; Pantegini *et al.*, 2014). Esta reacción supone la base de la determinación de la actividad de la LDH en el laboratorio a través de la tasa de producción NADH por espectrofotometría a 340 nm (Schumann *et al.*, 2002).

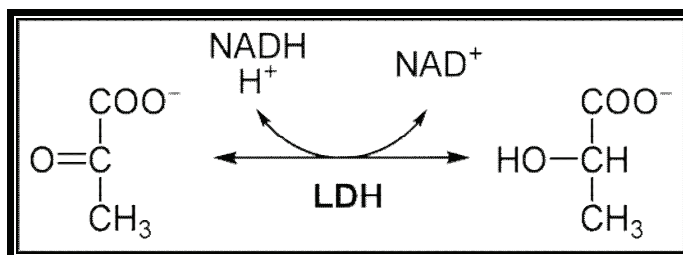


Figura 1.5.1.1. Reacción que cataliza lactato deshidrogenasa

LDH se encuentra en el citosol de todas las células humanas. El nivel de la enzima en los tejidos es muy elevado, unas 500 veces al encontrado en suero. Por tanto, una fuga de esta enzima de los tejidos, incluso de una zona pequeña, puede incrementar el nivel de LDH en suero. Sin embargo, su nivel aumenta como resultado de una lesión tisular inespecífica, por esta razón se puede elevar en diferentes procesos clínicos (Drent *et al.*, 1996).

1.5.2. LDH en líquido pleural.

Es un parámetro que se determina habitualmente en el estudio diagnóstico del derrame pleural y su determinación en líquido pleural y suero se ha mostrado útil para diferenciar exudados y trasudados. De tal forma, que un valor en líquido pleural mayor de 200 U/L tiene una sensibilidad de 72 % y una especificidad de 100 %. Mientras que el cociente de la LDH de líquido pleural y suero mayor de 0,6 posee una sensibilidad del 88 % y especificidad del 96 % para diferenciar exudados y trasudados. Si a estos dos parámetros se les une el cociente de proteínas en líquido pleural y suero mayor de 0,5, la sensibilidad se eleva a 99 % (Light *et al.*, 1972).

Los estudios de Wroblewski y col, sugirieron que una elevación de la LDH en líquido pleural era característica de derrames malignos y que los derrames benignos presentaban niveles más bajos de LDH (Wroblewski *et al.*, 1958). Posteriormente, se

ha comprobado que la determinación de la LDH no tiene valor en el diagnóstico diferencial de los exudados pleurales, y aunque su papel para discriminar entre los diferentes tipos de exudados es limitado, su elevación refleja el grado de inflamación pleural (Light *et al.*, 1972). Si aumenta en toracocentesis repetidas, indica un incremento del grado de inflamación pleural y en estos casos, se recomienda buscar la etiología del derrame de una forma más agresiva (Light, 2013). Además, se ha observado un aumento de los valores de LDH a las 48 horas tras la realización de una biopsia pleural en los exudados linfocitarios, pero no tras la realización de una toracocentesis diagnóstica (Haro-Estradiol *et al.*, 2007). Se ha observado que la mayoría de derrames que cumplen criterios de exudado por la LDH, pero no por las proteínas, suelen ser derrames pleurales malignos o paraneumónicos (Light, 1972; Sahn *et al.*, 1988).

Donde más utilidad se le ha atribuido es en el manejo del derrame pleural metaneumónico. Las concentraciones de LDH aumentan a medida que progresa de la fase exudativa hacia la fase organizativa, en consecuencia, valores de LDH pleural superiores a 1000 U/L se encuentran en las fases fibrinopurulenta y organizativa de los derrames pleurales paraneumónicos y empiemas, y se ha relacionado con la formación de adherencias pleurales (Bharnagar *et al.*, 2013). En estos casos, junto a los valores descendidos de glucosa en líquido pleural, representan una alternativa al pH para identificar al DPP infectado (Davies *et al.*, 2010).

Son varios los trabajos que han relacionado valores elevados de LDH con una disminución de la supervivencia y falta de éxito en el manejo de los derrames malignos (Martínez Moragón *et al.*, 1998; Bielsa *et al.*, 2008; Clive *et al.*, 2014; Verma *et al.*, 2016). Valores de LDH por encima de 1500 U/L predijeron una peor supervivencia en pacientes con adenocarcinoma que presentaban derrame pleural en el momento del diagnóstico inicial, además, resultó ser más preciso que ECOG en

la identificación de pacientes con peor supervivencia (Verma *et al.*, 2016). Se ha encontrado valores de LDH significativamente superiores en los derrames malignos masivos respecto a los de menor cuantía (Porcel *et al.*, 2003).

Puesto que los hematíes contienen una gran cantidad de LDH, la presencia de sangre en el líquido pleural, puede incrementar las concentraciones de LDH pleural (Ugurman *et al.*, 2003; Porcel *et al.*, 2008). En consecuencia, esta circunstancia puede influir en la clasificación errónea de los trasudados (Eid *et al.*, 2002; Ugurman *et al.*, 2003; Porcel *et al.*, 2008).

1.5.3. Isoenzimas de LDH

La enzima LDH posee un peso molecular de 140 KDa. Es un tetrámero compuesto por subunidades de peso molecular 35.000 daltons cada una (Figura 1.5.3.1). Las subunidades, consisten en dos formas, H ("Heart", corazón) y M ("Muscle", músculo), las cuales se encuentran polimerizadas para formar las cinco isoenzimas de LDH, LDH-1 a LDH-5, con diferentes propiedades físicas y químicas (McKenzie *et al.*, 1983).

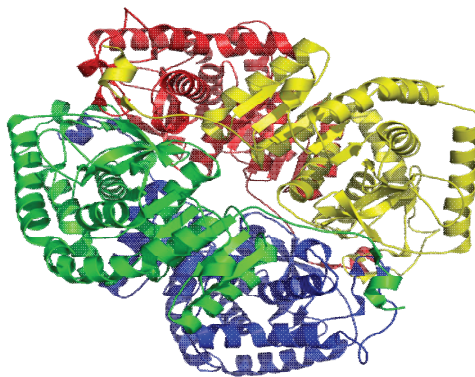


Figura 1.5.3.1. Lactato deshidrogenasa (LD, LDH; (S)-lactato-NAD⁺, EC 1.1.1.27

Las isoenzimas de LDH presentan diferentes afinidades por el lactato o el piruvato y difieren en su estructura molecular (Nevin *et al.*, 1988). Mientras LDH1 comprende cuatro subunidades H (H₄), LDH5 está compuesta por cuatro subunidades M (M₄). Las isoenzimas LDH2, LDH3 y LDH4, comprenden H₃M, H₂M₂ y H₁M₃, respectivamente (Figura 1.5.3.2).

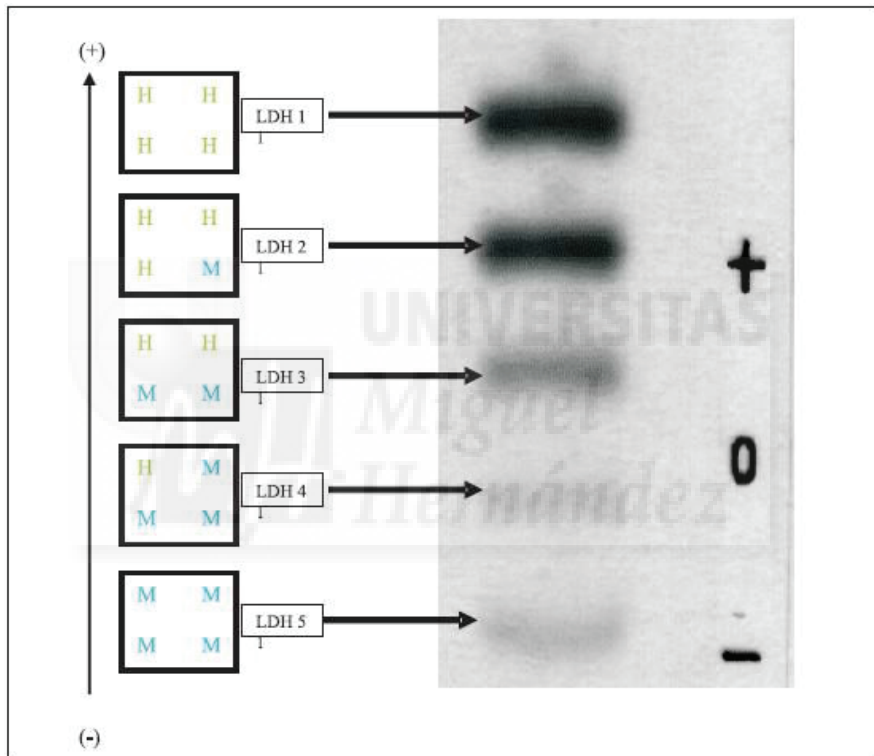


Figura 1.5.3.2. Patrón electroforético y composición de cada una de las isoenzimas de lactato deshidrogenasa

El aislamiento electroforético discrimina entre LDH-1 y LDH-2, isoenzimas aeróbicamente activas, y LDH-4 y LDH-5, isoenzimas anaeróbicamente activas. Se ha propuesto que los perfiles isoenzimáticos pueden variar según las necesidades

metabólicas de los diferentes tejidos y que esta variación puede producirse en respuesta a diferentes procesos como la isquemia, inflamación o cáncer (Giannoulaki *et al.*, 1989). El nivel de la enzima en los tejidos es muy elevado, unas 500 veces en comparación con el suero, por tanto las fugas de esta enzima de los tejidos, incluso de una zona pequeña, puede incrementar el nivel de LDH en suero. La concentración de las isoenzimas en suero normal es: LDH1: 19-30 %, LDH2: 32-48 %, LDH3: 12-22 %, LDH4: 5-11 %, LDH5: 5-13 % (Drent *et al.*, 1996).

La enzima LDH se encuentra en el citoplasma de todas las células, por tanto, su valor de especificidad diagnóstica es limitado, si no fuese por la presencia de isoenzimas, que presentan actividades diferentes en los distintos tejidos. Mientras el corazón, los hematíes y el riñón muestran un predominio de LDH1, las isoenzimas intermedias LDH2, LDH3 y LDH4 derivan principalmente de los leucocitos, pulmón, bazo, ganglios linfáticos y plaquetas. La LDH5 se encuentra fundamentalmente en el hígado y el músculo esquelético (Wroblewski *et al.*, 1961; Pantegini *et al.*, 2014). Al ser más o menos órganos específicos, los patrones de isoenzimas pueden utilizarse para localizar la fuente de liberación de LDH.

El patrón pulmonar se caracteriza por un aumento proporcional de las isoenzimas LDH3, LDH4 y LDH5, y se ha sugerido que la elevación en plasma de la actividad de LDH3 refleja un daño celular pulmonar (Hagadorn *et al.*, 1971).

1.5.4. Estudios de isoenzimas de LDH en líquido pleural

La elevación de los valores séricos de LDH se describe en numerosos procesos pulmonares, tanto en enfermedades obstructivas, infecciones o enfermedades intersticiales. En consecuencia, se ha sugerido que la elevación en

plasma de la actividad de la LDH refleja un daño celular pulmonar. Se han encontrado valores muy altos de LDH en líquido procedentes del lavado broncoalveolar en enfermos con neumonía por *Pneumocystis carinii* (actualmente *P. jirovecii*) a expensas de LDH3. Los autores refieren que los valores encontrados en el suero son de origen pulmonar y reflejan el flujo de LDH del pulmón a la sangre a través de la membrana alveolo-capilar comprometida (Smith *et al.*, 1988). Además, en el embolismo pulmonar inducido en animales, se ha descrito la elevación en plasma de la actividad LDH3 (Ben *et al.*, 2007).

En estos casos, el origen de la LDH parece estar en el daño o muerte celular, la inflamación, el remodelado o una combinación de estos mecanismos (Hagadorn *et al.*, 1971). Y aunque clásicamente, los estudios enzimáticos se han realizado en suero, también se pueden llevar a cabo en distintos fluidos orgánicos (Smith *et al.*, 1988; Paavonen *et al.*, 1991; Drent *et al.*, 1996).

Como se ha descrito previamente, LDH es un parámetro que se determina habitualmente en el estudio diagnóstico del líquido pleural y su actividad ha sido estudiada ampliamente. No obstante, al tratarse de un marcador inespecífico de inflamación, su valor diagnóstico es limitado. Con el fin de aumentar su capacidad diagnóstica, se ha propuesto que la medición de los niveles de la actividad de LDH y su patrón de isoenzimas podría aportar información adicional (Wroblewski *et al.*, 1961).

En este sentido, Richerich y Burger (1963) encontraron que el patrón de isoenzimas en los derrames benignos era similar al del suero, mientras que los derrames malignos contenían más LDH4 y LDH5. Por el contrario, en 1973, en una serie de 90 pacientes, Light y Ball describieron una elevación de LDH4 y LDH5 en los exudados benignos y una mayor actividad de LDH2, LDH3 y LDH4 en los derrames

maligos con respecto al suero (Light *et al.*, 1973). Además, encontraron en los trasudados pleurales un patrón similar al suero, aunque con un ligero aumento de LDH4 y LDH5 respecto a los valores séricos, y diferencias entre los exudados de origen benigno y maligno. De tal manera que, alrededor de un tercio de los derrames malignos tenían elevada la LDH2 con una reducción correspondiente de LDH4 y LDH5 (Light *et al.*, 1973). Estos resultados, fueron similares a los obtenidos por Fröhlich y Keller para la separación entre exudados pleurales benignos y malignos. Encontraron que los derrames malignos se caracterizan por una actividad enzimática máxima de LDH2, LDH3 y LDH4, mientras que en derrames benignos se hallan aumentados los niveles de LDH4 y LDH5 (Fröhlich *et al.*, 1967).

Por otro lado, se ha observado que el patrón de las isoenzimas en líquido pleural difiere de las del suero. En 1991, Paavonen y col, en un estudio que incluía 22 derrames de origen benigno y 14 malignos, obtuvieron diferencias en la distribución de las isoenzimas entre el suero y el líquido pleural. De tal forma que, LDH4 y LHD5, resultaron las isoenzimas predominantes, independientemente del origen del benigno o maligno del derrame (Paavonen *et al.*, 1991).

En cuanto a la aportación de las isoenzimas para la identificación de la causa del derrame, Vergnon y col (1984) obtuvieron patrones de isoenzimas diferentes característicos, pero no patognomónicos, en 100 pacientes con derrame pleural. Además, en el derrame pleural maligno, encontraron una elevación de LDH5 en líquido pleural, con excepción de los linfomas y el cáncer microcítico. Del mismo modo, Lossos y col encuentran que la determinación de las isoenzimas puede ser útil en el diagnóstico diferencial de los derrames pleurales (Lossos *et al.*, 1997; Lossos *et al.*, 1999). En su estudio, los autores establecen un algoritmo diagnóstico cuando la posibilidades diagnósticas se limitan a derrames paraneumónicos, malignos o secundarios a insuficiencia cardiaca (Lossos *et al.*, 1997).

En este último trabajo, encontraron más de un patrón de isoenzimas de LDH en los derrames malignos. Los autores sugieren que podría ser debido a que los distintos tejidos neoplásicos secretarían diferentes isoenzimas (Lossos *et al.*, 1997). Además, se ha observado que los linfomas y los carcinomas de célula pequeña se diferencian de otros tumores al presentar una baja actividad de LDH5 (Vergnon *et al.*, 1984). Sin embargo, Light en 1973, no encontró ninguna relación entre el patrón de las isoenzimas en el líquido pleural y el tipo histológico en los 28 derrames malignos que incluía su serie (Light *et al.*, 1973).

La asociación de la citología del líquido pleural y las isoenzimas de LDH se ha descrito en la literatura de forma anecdótica. Nevin y col (1988) describieron que los niveles de subunidades M en derrames malignos con citología positiva fueron significativamente más altos que en aquellos que no se demostró malignidad. En este sentido, se ha sugerido que la determinación de isoenzimas de LDH podría contribuir a la evaluación citológica y sugerir un origen maligno incluso en derrames malignos con citología negativa (Lossos *et al.*, 1999). En su estudio que incluía doce derrames malignos, Lossos y col (1999), aplicando un patrón isoenzimático determinado eran capaces de predecir el origen maligno del derrame en 82 % de los pacientes con citología positiva y en 83 % de derrames que presentaban una citología negativa. En este sentido, los autores sugieren que la determinación de las isoenzimas podría aportar información al estudio citológico y orientar un origen neofornativo en aquellos derrames malignos con citología negativa. Además, en un trabajo anterior de los mismos autores, analizaron el comportamiento de las isoenzimas de la LDH en la evolución del derrame, no encontrando cambios en el patrón isoenzimático sino cambiaba su etiología (Lossos *et al.*, 1997).

Kotzya y col obtuvieron que los valores del cociente LDH5/LDH1 era mayor en los casos de tumores no microcíticos y cuando existía confirmación de la invasión

pleural. En cambio este cociente se encontraba disminuido en los carcinomas no microcíticos o en aquellos derrames sin afectación tumoral (Kotzya et al., 2009).

En el trabajo de Saint-Remy, el perfil isoenzimático de los trasudados solo difería del suero por un ligero aumento de LDH4 y LDH5. Además, en los exudados, el perfil de las isoenzimas fue el inverso al sérico, con un descenso de la actividad de LDH1 y LDH2, y elevación de LDH4 y LDH5. En cambio, las isoenzimas aportaron poca información respecto al origen de los exudados (Saint-Remy *et al.*, 1996).

Cobben et al., (1997) en un estudio de 93 pacientes, obtuvieron diferencias significativas en el patrón de las isoenzimas entre trasudados y exudados paraneumónicos o malignos. El porcentaje de LDH1 fue mayor en el grupo de trasudados. Mientras que el porcentaje de LDH4 y LDH5 fue superior en el grupo de exudados. En cambio, LDH4 y LDH5 mostraron diferencias entre los derrames malignos respecto a los trasudados y los derrames paraneumónicos. Si bien estos resultados no aportaron un valor discriminatorio adicional (Cobben *et al.*, 1997).

La asociación entre las células inflamatorias y los hematíes presentes en el líquido pleural con la LDH se describe en la literatura de forma anecdótica. En el empiema, la elevación de LDH5 encontrado, podría derivar del incremento de leucocitos polimorfonucleares en líquido pleural (Vergnon *et al.*, 1984). Sin embargo, Paavonen et al (1991) no encontraron ninguna relación. La presencia de concentraciones elevadas de hematíes en líquido pleural puede incrementar las concentraciones de LDH (Ugurman *et al.*, 2003; Porcel et al., 2008). Sin embargo, Light y Ball analizaron las isoenzimas de LDH en 12 derrames hemáticos (> 100.000 hematíes/mm³), y encontraron que únicamente 5 de ellos presentaban un ligero incremento de LDH1 en líquido pleural respecto al suero, y tan solo en un caso,

obtuvieron valores de LDH1 con un 5 % por encima del perfil sérico (Light *et al.*, 1973).

En resumen, de los diferentes trabajos se desprende que los pacientes tienen patrones isoenzimáticos diferentes en función de la causa del derrame pleural. En general, los trasudados tienen un predominio de LDH1 y LDH2, similar a la composición del suero. Mientras que el porcentaje de LDH4 y LDH5 es superior en el grupo de exudados. Aunque existen discrepancias en algunos resultados, varios autores concluyen que la determinación de isoenzimas de LDH puede aportar información de interés diagnóstico.





JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

El derrame pleural es una entidad frecuente, en la que pueden participar múltiples causas. Existen numerosos parámetros bioquímicos que contribuyen a acotar las posibilidades diagnósticas. Sin embargo, aunque los parámetros bioquímicos son una parte fundamental del estudio del derrame pleural, todavía existe un notable margen de incertidumbre y, en muchos casos, conocer su etiología resulta difícil de establecer. Por todo ello, se requiere evaluar la eficacia de nuevos marcadores que contribuyan a ayudar en el proceso diagnóstico.

Las isoenzimas de lactato deshidrogenasa se han utilizado para determinar la naturaleza del líquido pleural. Sin embargo, el estudio de isoenzimas de LDH en líquido pleural no se ha realizado de forma sistemática en una serie amplia de pacientes. Su estudio se ha limitado a un escaso número de etiologías y aunque algunos datos publicados sugieren que pueden tener interés clínico, han mostrado resultados contradictorios. En cualquier caso, su composición en el líquido pleural así como su utilidad diagnóstica no se encuentran bien definidas.

En base a estos hechos, planteamos las siguientes hipótesis:

1. Los valores y proporciones de isoenzimas de la LDH en líquido pleural son diferentes en función de la etiología del derrame.
2. Las diferencias entre estos valores y sus proporciones, en función del diagnóstico, pueden contribuir a establecer la causa de los derrames en el estudio diagnóstico del derrame pleural.



OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

El objetivo del presente trabajo es definir la composición de isoenzimas de LDH en las distintas causas de derrame pleural y evaluar su aportación al estudio del derrame pleural.

Para llevarlo a cabo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

3.2 Objetivos específicos

1. Estudiar la composición de las isoenzimas de LDH en los trasudados y exudados, así como analizar su aportación a la separación de trasudados y exudados.
2. Estudiar la distribución de las isoenzimas de LDH y su aportación a la diferenciación entre derrames pleurales benignos y malignos.
3. Evaluar la composición y aportación de las isoenzimas de la LDH a la diferenciación entre derrames exudativos benignos y derrames malignos.
4. Analizar la composición de las isoenzimas de LDH y su aportación diagnóstica entre los derrames malignos, y estudiar su contribución a la citología.
5. Estudiar el perfil de isoenzimas de LDH y su aportación en los exudados benignos.
6. Analizar la relación de las isoenzimas de LDH con los hematíes y las células inflamatorias en el líquido pleural.



MATERIAL Y MÉTODO

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. Ámbito y diseño del estudio

El estudio se ha realizado en el Hospital General Universitario de Elche, un hospital de 470 camas y un ámbito poblacional de 163.000 habitantes. Se trata de recogida prospectiva de casos con análisis retrospectivo, independiente y ciego.

4.2. Pacientes. Criterios de inclusión

Para determinar el significado de la LDH y de sus isoenzimas en los derrames pleurales, se han incluido a pacientes consecutivos con derrame pleural a los que se les realizó una toracocentesis diagnóstica entre abril de 2015 y septiembre de 2016. Se han revisado las historias clínicas y, de cada paciente, se han recogido los siguientes datos: edad, sexo, análisis bioquímico del líquido pleural y de sangre.

Cuando el paciente precisó más de una toracocentesis para su estudio, únicamente se consideró el resultado de la primera determinación. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado antes del procedimiento, y no presentaban ningún criterio de exclusión.

4.3. Criterios de exclusión

Se excluyeron aquellos casos que presentaban más de un diagnóstico alternativo, los que no se pudo establecer un diagnóstico definitivo en el momento del diagnóstico, y no disponían de seguimiento de al menos un año.

4.4. Criterios diagnósticos del derrame pleural

El diagnóstico etiológico se ha establecido en base a los criterios previamente aceptados en la literatura (Romero *et al.*, 1996). Los derrames pleurales se clasificaron individualmente en trasudados y exudados tras una estricta evaluación detallada de todos los datos clínicos, los criterios de Light (1972) y los resultados de las exploraciones realizadas. Únicamente se consideraron los resultados obtenidos en la primera toracocentesis.

- TRASUDADOS: Se consideraron en las enfermedades en las que no existió afectación pleural directa: insuficiencia cardiaca congestiva, cirrosis hepática, síndrome nefrótico, hipoalbuminemia y urinotórax
- EXUDADOS:
 - Derrame pleural maligno: se incluyeron en este grupo a pacientes con un estudio citohistológico de malignidad en el espacio pleural, y cuando el derrame se asoció a una enfermedad maligna conocida sin que existiera un diagnóstico alternativo, y la evolución fue clínica y radiológicamente compatible con un derrame pleural maligno.
 - Derrame paraneumónico: pacientes que presentaban tos, fiebre y un infiltrado radiológico, en ausencia de otras causas de derrames.
 - Empiema pleural: se consideró empiema pleural a los líquidos con aspecto macroscópico purulento o el aislamiento de gérmenes diferentes a *Mycobacterium tuberculosis* en el líquido pleural.
 - Derrame pleural tuberculoso. Se incluyeron en este grupo a los pacientes que cumplía alguno de los siguientes criterios:
 - Demostración del *Mycobacterium tuberculosis* en el líquido o tejido pleural.

- Presencia de granulomas en el tejido pleural en ausencia de otras causas capaces de producirlos.
 - Evidencia de tuberculosis extrapleural junto con niveles de ADA en líquido pleural superiores a 45 U/L.
- Tromboembolismo pulmonar: se estableció mediante la sospecha clínica corroborada por un angioTC torácico o gammagrafía de ventilación-perfusión de alta probabilidad.
- Derrames pleurales postraumáticos, iatrogénicos, o postquirúrgicos: se consideraron los derrames claramente relacionados con un traumatismo, iatrogenia o tras intervención quirúrgica respectivamente.
- Asociado a enfermedades del colágeno, sin que existiera un diagnóstico alternativo.
- Idiopático: cuando tras realizar un estudio completo y un seguimiento durante un año, no se logró encontrar la causa del mismo.

Los distintos grupos diagnósticos se establecieron antes de la determinación de las isoenzimas LDH.

4.5. Técnica de toracocentesis y biopsia pleural

La toracocentesis diagnóstica es la extracción de líquido de la cavidad pleural diagnósticos a través de una punción transparietal con el objetivo de alcanzar un diagnóstico etiológico (Sahn, 1988). La exploración se realiza con el enfermo sentado con la espalda erguida. Para localizar el punto más adecuado donde realizar la punción se utilizan los estudios radiológicos y la exploración física. La

toracocentesis se realiza habitualmente a través de la pared posterior del tórax, varios centímetros lateralmente a la columna vertebral y se introduce la aguja justo por encima del borde de la costilla inferior para evitar el paquete vasculonervioso intercostal. La pared torácica es desinfectada con povidona yodada u otro antiséptico, en un radio de varios centímetros alrededor del punto escogido para la punción. Se puede utilizar un anestésico local como lidocaína o mepivacaína al 1-2 % con aguja intramuscular. Se usa una aguja fina (calibre 21-22 G) conectada a una jeringa de 20 ml. El líquido se extrae de forma gradual y se envía al laboratorio para estudio bioquímico, microbiológico y anatomopatológico (Villena *et al.*, 2005).

La biopsia pleural está especialmente indicada cuando se duda entre tuberculosis o neoplasia, en los pacientes que presentan un exudado pleural de etiología desconocida. La biopsia pleural cerrada se realiza de forma similar a la toracocentesis. Se puede realizar con una aguja de Cope o de Castelain, o con Tru-cut. Con una hoja de bisturí se puede realizar una incisión de 5 mm de ancho y de profundidad para facilitar la introducción de la aguja de biopsia pleural cerrada con maniobras de rotación-presión (Villena *et al.*, 2005). Una vez obtenidas las muestras se remiten para estudio histológico y microbiológico para cultivo en medio de Löwenstein.

4.6. Técnicas microbiológicas en el estudio del derrame pleural

Tras la realización de la toracocentesis, se remitieron 5 mL de líquido pleural en un tubo estéril para la realización de la tinción de gram, cultivo convencional en los medios habituales e investigación de micobacterias. En caso de sospecha de derrame pleural paraneumónico, se remitieron dos botellas para cultivo en medio aerobio y anaerobio (BACTEC™ Plus) con 2,5 mL de líquido pleural en cada una de ellas. Para la investigación de micobacterias, se realizó la tinción con la técnica de

Ziehl-Neelsen, siendo cultivadas posteriormente en medio de Löwenstein- Jensen. Además, se realizó la PCR directa para la detección de ADN (Fluortype MTB, HDIN).

4.7. Técnicas de anatomía patológica en el estudio del derrame pleural

Se remitieron 10 mL de líquido pleural en un tubo estéril para el estudio citológico tras la toracocentesis. Tras la recepción de la muestra, se realizó una tinción de Papanicolaou y/o Hematoxilina-Eosina. Para la obtención del bloque celular, se centrifugó el líquido pleural a 1500 rpm durante 9 minutos. Una vez fijado el material obtenido con plasma y trombina (Thromborel® S Siemens), es procesado del mismo modo que una biopsia y se aplican técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas, según proceda.

4.8. Recuento celular y diferencial de las células del líquido pleural

Se enviaron 5 mL de líquido pleural en un tubo heparinizado (tubos Vacutainer™ con K₂EDTA (Becton Dickinson, USA) para el recuento celular y diferencial de los leucocitos del líquido pleural, y la determinación del número de hematíes. El recuento celular global y diferencial se realizó de forma manual mediante la cámara de Neubauer.

4.9. Técnicas bioquímicas en el estudio del derrame pleural

Se remitieron 10 mL de líquido pleural en un tubo heparinizado (Vacutainer™. Becton Dickinson, USA) para el análisis bioquímico del líquido pleural. Todos los parámetros bioquímicos se determinaron en el momento de la toracocentesis, excepto la determinación de la actividad de las isoenzimas de la LDH. Las determinaciones se realizaron en un analizador automático VITROS 5600 Chemistry System. Johnson & Johnson.

Para la medida del pH, se remitieron 2 mL de líquido pleural en una jeringa heparinizada en condiciones de anaerobiosis. Se determinaron inmediatamente en un analizador de gases ABL 90 flex plus (Radiometer Medical ApS. Denmark).

La actividad de total de LDH (U/L), se midió a 37 ° C utilizando un analizador automático Vitros 5600, Ortho Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson Company, Raritan, NJ, EEUU. El método se basa en la determinación a partir de la velocidad de formación de NADH que es directamente proporcional a la actividad catalítica de la LDH y se obtiene midiendo el aumento de absorbancia a 340 nm. El valor de referencia en suero de la actividad de LDH en nuestro laboratorio es de 618 UI/L.

4.10. Técnica para la determinación de las isoenzimas de LDH

La determinación de isoenzimas en líquido pleural se realizó en el laboratorio del Hospital General Universitario de Elche. Para la preparación de las muestras, el líquido pleural se centrifugó inmediatamente tras su recepción en laboratorio a 3000 rpm durante 15-20 minutos. Posteriormente, se extrajeron 2 cc del sobrenadante resultante que fue introducido inmediatamente en frascos estériles y congelado a - 80 ° C para su conservación y hasta que se realizó el análisis enzimático (Figura 4.10.1). Previamente se comprobó que el perfil isoenzimático del líquido pleural no se modificaba tras su descongelación. Para ello se realizaron varias determinaciones mediante electroforesis a seis muestras elegidas al azar.

En el presente trabajo, las isoenzimas de LDH se separaron mediante electroforesis. Para su determinación, se necesitan pequeñas muestras y es un

método rápido, fácil y económico en contraste con otras técnicas como la citometría y los estudios de transposición genética. La separación electroforética se basa en la diferencia de velocidad de migración que experimentan en un campo eléctrico las distintas partículas cargadas eléctricamente. La determinación de la LDH total se basa en cuantificar la interconversión entre el NAD^+ y NADH mediante la lectura de absorbancia a 340 nm. La separación electroforética se realizó en gel de agarosa. Tras la migración electroforética, se aplica sobre el gel una mezcla de reacción que contiene lactato y NAD^+ . De modo que las cantidades relativas de cada isoenzima pueden determinarse por densitometría.

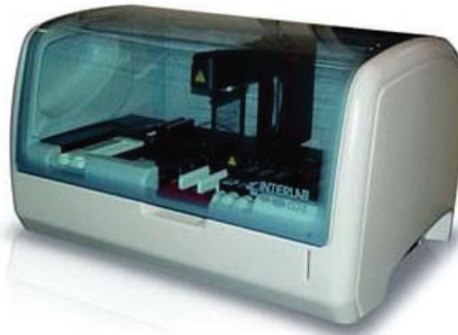
Figura 4.10.1. Alícuotas de líquido pleural



Sobrenadante del líquido pleural obtenido tras la centrifugación

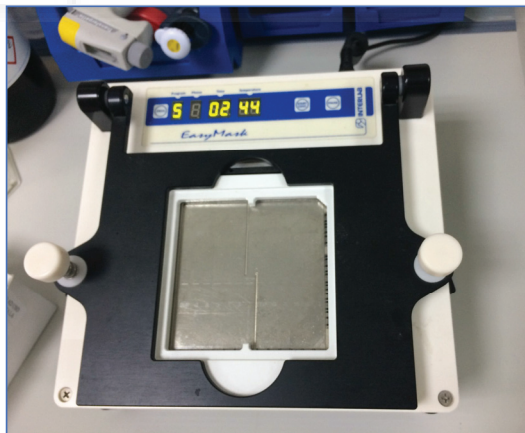
Para la determinación del patrón electroforético de las isoenzimas de LDH, se utilizó un autoanizador Interlab G26 (Interlab Srl. Italy) (Figura 4.10.2) y el kit de reactivos SRE612K (Interlab Srl. Italy) para la determinación cuantitativa y cualitativa de las isoenzimas LDH mediante electroforesis en gel agarosa tamponado a pH 8,0 (Figura 4.10.2).

Figura 4.10.2. Equipo de electroforesis Interlab G26



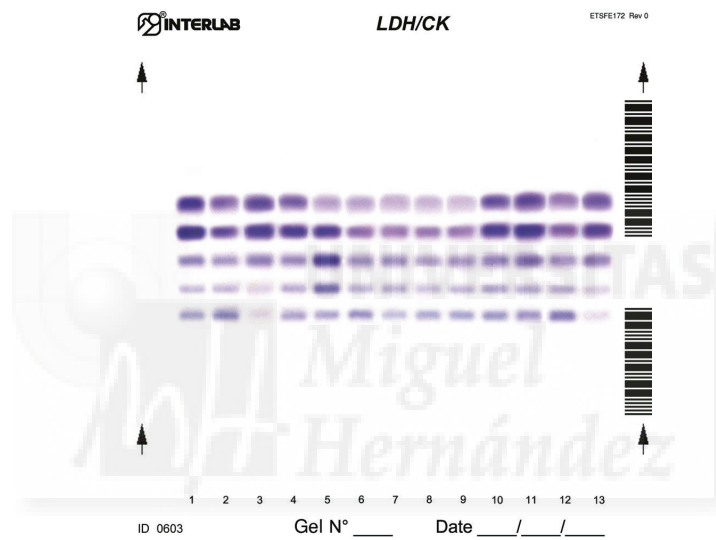
La electroforesis se llevó a cabo a 100 voltios durante 30 minutos. Después de la separación electroforética, se incubaron los geles con un reactivo de tinción específico para la enzima durante 30 minutos a 45 ° C en cámara húmeda (Figura 4.10.3).

Figura 4.10.3. Sistema para incubación de los geles con reactivo de tinción para la enzima



Las isoenzimas de LDH se visualizaron por la presencia de bandas en gel de agarosa (Figura 4.10.4) y se cuantificaron a 600 nanómetros en un densitómetro. En función de la movilidad electroforética, la isoenzima LDH1 es la que más avanza hacia ánodo mientras que la isoenzima LDH5 es la de menor movilidad electroforética.

Figura 4.10.4. Bandas de isoenzimas de LDH en gel de agarosa



Desde ánodo a cátodo: LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 y LDH5

La actividad en cada banda es proporcional al área pico en el densitograma. (Figura 4.10.5). La lectura densitométrica proporcionó las concentraciones relativas de la actividad enzimática total de LDH y la actividad de cada isoenzima se calculó como porcentaje de la actividad enzimática total. Para calcular las subunidades H y M, se asignaron las proporciones de subunidades LDH-M y LDH-H en función de la composición de las isoenzimas (Figura 4.10.6).

Figura 4.10.5. Lectura densitométrica de las isoenzimas de LDH

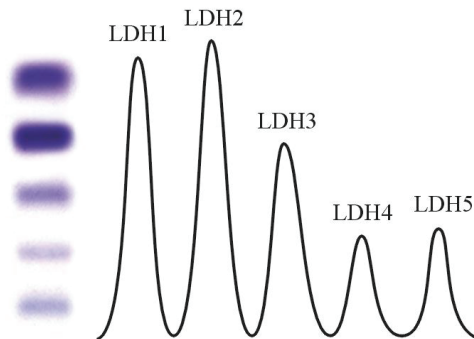


Figura 4.10.6. Cálculo de las subunidades LDH-M y LDH-H

$$\%LDH-M = \frac{1}{4} LDH2 + \frac{1}{2} LDH3 + \frac{3}{4} LDH4 + LDH5$$

$$\%LDH-H = \frac{1}{4} LDH4 + \frac{1}{2} LDH3 + \frac{3}{4} LDH2 + LDH1$$

4.11 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se elaboró una base de datos en el programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 21.0 para Windows (Microsoft® Office 2013). Se realizó un análisis descriptivo inicial de las variables incluidas. Para expresar los resultados de las variables cualitativas se utilizaron la frecuencia absoluta y relativa, expresada en porcentaje. En el caso de variables cuantitativas se utilizó la media (\bar{x}) y la desviación estándar (SD) si seguían una distribución normal, y la mediana y los percentiles 25 y 75, si no la seguían. Para comprobar el tipo de distribución se utilizó el test de contraste de normalidad de Kolgomorov-Smirnov.

Para comparar variables cuantitativas se utilizó la t de Student para distribuciones normales y la U de Mann-Whitney para distribuciones no normales.

Para la comparación de proporciones independientes se usó la prueba de chi-cuadrado de Pearson. Para estudiar la relación entre variables cuantitativas se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson si las variables seguían una distribución normal, o el coeficiente de correlación de Spearman para las de distribución no gaussiana. Para analizar la eficiencia diagnóstica se utilizó el análisis de curvas de operador receptor (ROC).

En todos los casos se consideró que existía significación estadística cuando el valor de la p fue < 0.05 . Valores de p entre $p > 0.05$ y $p < 0.1$ fueron considerados como tendencia de cambio.

4.12 Conflictos éticos

Este trabajo ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Elche. Previamente a la realización de la toracocentesis, se obtuvo el consentimiento informado en todos los casos.



RESULTADOS

5. RESULTADOS

Se han recogido y congelado a -80°C un total de 162 derrames pleurales durante un periodo de 18 meses. De ellos, se excluyeron once casos. Tres al no disponer de un diagnóstico de certeza en el momento del análisis, tres al producirse un fallo en el proceso de migración electroforética que invalidó su interpretación y cinco al presentar más de una potencial causa de derrame.

5.1. Características de los pacientes

Se han incluido un total de 151 derrames pleurales procedentes de pacientes con un promedio de edad de 68 ± 14 años (rango 17-94). La distribución por sexos fue 69 (46 %) mujeres y 82 (54 %) hombres.

5.2. Etiología de los derrames pleurales

Las causa más frecuente de los derrames estudiados fue el derrame pleural maligno seguido de la insuficiencia cardiaca y el derrame pleural paraneumónico. En la tabla 5.2.1 se detalla la etiología de los derrames incluidos en el estudio.

Tabla 5.2.1. Etiología de los derrames pleurales

Etiología	n	%
Trasudados	37	24,5
ICC	29	19,2
Hepático	6	7,9
Otros	2	1,6
Exudados	114	75,5
Maligno	60	39,7
Paraneumónico	14	8,2
Idiopáticos	12	8
Postquirúrgicos	11	7,3
Urémico	3	2
TEP	3	2
Pancreatitis	4	2,6
Pleuropericarditis	3	3
Absceso abdominal	2	2
Artritis reumatoide	1	0,7
Exposición asbesto	1	0,7

Los principales parámetros bioquímicos determinados de los líquidos pleurales se resumen en la tabla 5.2.2. Se han establecido las diferencias entre trasudados y exudados. Como se esperaba, la concentración de proteínas y de LDH fue significativamente mayor en el grupo de los exudados.

Tabla 5.2.2. Características bioquímicas de trasudados y exudados

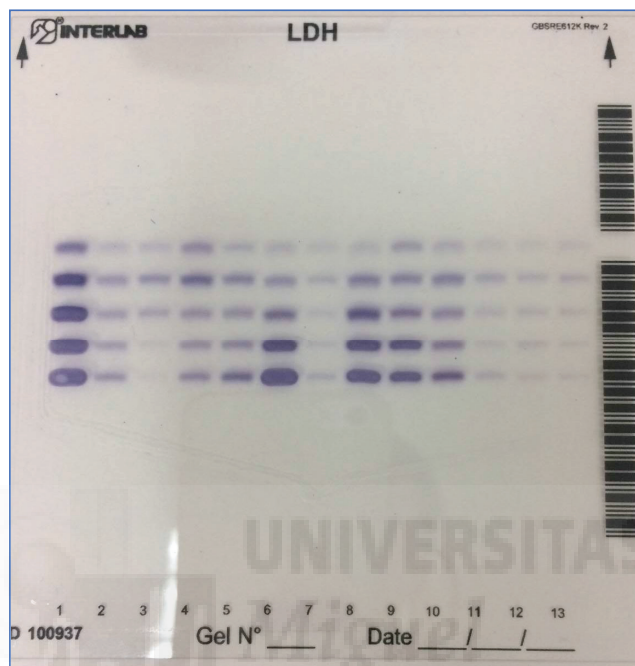
Parámetro	Trasudados	Exudados	p
pH	7,46 ± 0,40	7,38 ± 0,11	0.004
Glucosa (mg/dL)	144 ± 60	108 ± 42	0,0001
Proteínas (g/dL)	2,33 ± 0,69	4,14 ± 0,9	0,0001
LDH (U/L)	255 ± 132	1279 ± 2138	0,0001
Hematíes (n/μL)	2131 ± 2619	42865 ± 107981	0,0001
Leucocitos (n/μL)	406 ± 339	2677 ± 8828	0,13

Valores expresados como media ± DE

5.3. Patrones electroforéticos

Según la movilidad electroforética se han encontrado cinco bandas, identificadas de ánodo a cátodo de acuerdo con su movilidad electroforética: LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 y LDH5, en los líquidos pleurales incluidos en el estudio. En la figura 5.3.1 se muestra placas de revelado en gel de agarosa con los patrones electroforéticos de isoenzimas de LDH. Cada columna corresponde a la determinación del líquido pleural de un paciente.

Figura 5.3.1. Electroforesis del líquido pleural



Análisis cualitativo de las bandas tras la electroforesis de 13 líquidos pleurales

Tras la obtención de las bandas se realizó un análisis cuantitativo. A partir de las concentraciones y de la actividad total de LDH se determinó la actividad para cada una de las isoenzimas. En las tablas 5.3.1 y 5.3.2 se detallan los resultados obtenidos tras la separación electroforética de los valores de las isoenzimas de LDH y las subunidades H y M de todos los líquidos estudiados. El patrón electroforético de todos los líquidos pleurales analizados presentó un predominio de LDH2, LDH5 y subunidades M.

Tabla 5.3.1. Valores absolutos y porcentaje de las isoenzimas de LDH de toda la muestra

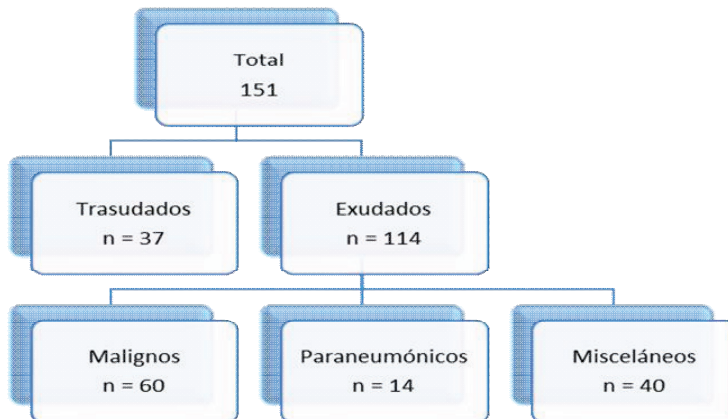
Actividad (U/L)	$\bar{x} \pm SD$	Actividad (%)	$\bar{x} \pm SD$
LDH1	109 ± 212	LDH1%	15 ± 9
LDH2	213 ± 389	LDH2%	25 ± 9
LDH3	212 ± 455	LDH3%	20 ± 5
LDH4	227 ± 449	LDH4%	19 ± 7
LDH5	268 ± 572	LDH5%	21 ± 12
LDH-H	431 ± 786	LDH-H%	48 ± 12
LDH-M	597 ± 1169	LDH-M%	52 ± 12

Valores expresados como media ± DE

5.4. Patrones electroforéticos de isoenzimas de LDH en el derrame pleural.

Para estudiar la distribución de las isoenzimas de LDH y sus subunidades, así como su aportación en el estudio del líquido pleural, se clasificaron a los pacientes en función de los grupos diagnósticos que se muestran en la figura 5.4.1.

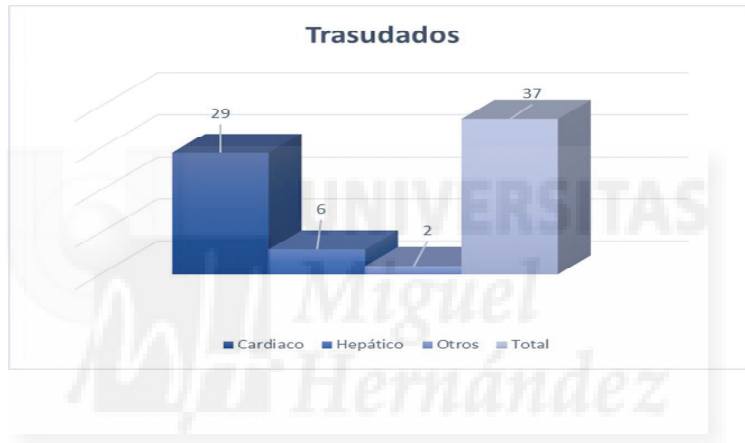
Figura 5.4.1. Diagrama con los derrames pleurales divididos por grupos diagnósticos



5.4.1. Trasudados

De los 151 líquidos analizados, 37 (24,5 %) fueron clasificados como trasudados. La causa más frecuente en este grupo fue la insuficiencia cardiaca congestiva, seguida de los derrames de origen hepático. En los otros dos pacientes restantes, la causa del derrame trasudativo fue la presencia de una fístula pleuroperitoneal en un paciente sometido a diálisis y en otro caso fue atribuible a secundaria a sobrecarga hídrica (Figura 5.4.1.1.).

Figura 5.4.1.1. Causas de Trasudado



Encontramos que los trasudados pleurales presentan un mayor porcentaje de isoenzimas LDH1 y LDH2, con un predominio de las subunidades H (Tablas 5.4.1.1).

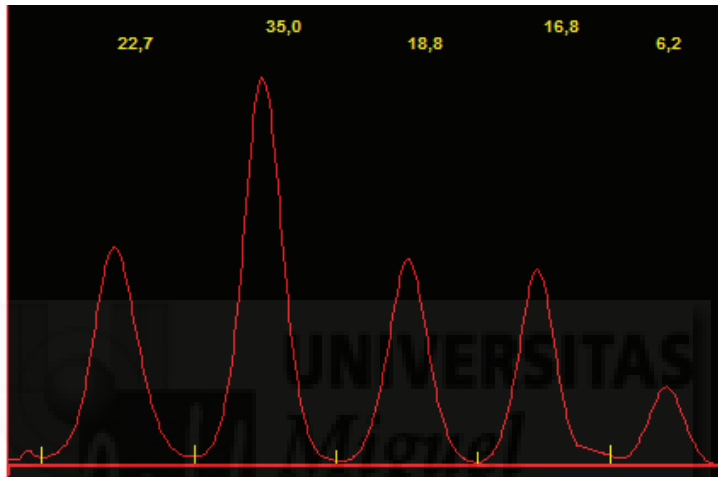
Tabla 5.4.1.1. Valores absolutos y porcentaje de Isoenzimas de LDH de los trasudados

Actividad (U/L)	$\bar{x} \pm SD$	Actividad (%)	$\bar{x} \pm SD$
LDH1	60 ± 45	LDH1%	24 ± 11
LDH2	78 ± 51	LDH2%	30 ± 9
LDH3	50 ± 22	LDH3%	20 ± 5
LDH4	37 ± 25	LDH4%	14 ± 7
LDH5	31 ± 23	LDH5%	12 ± 8
LDH-H	152 ± 90	LDH-H%	59 ± 10
LDH-M	102 ± 52	LDH-M%	40 ± 10

Valores expresados como media ± DE

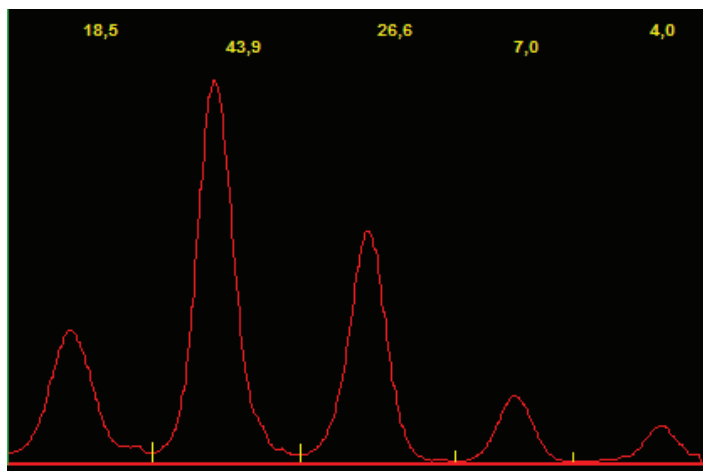
A continuación se muestran los patrones electroforéticos de dos casos de trasudados. La figura 5.4.1.2 corresponde a un caso de insuficiencia cardiaca congestiva. La figura 5.4.1.3 corresponde a un trasudado por cirrosis hepática.

Figura 5.4.1.2. Electroforesis de un trasudado pleural



Trasudado debido a Insuficiencia cardiaca .Se aprecia los picos de LDH1 y LDH2.

Figura 5.4.1.3 Electroforesis de un trasudado pleural



Trasudado secundario a cirrosis hepática. Se aprecia un predominio de LDH2 y LDH3

Cuando se compararon las principales causas de trasudado, el porcentaje de LDH3 fue significativamente superior en el grupo de trasudados de origen hepático (Tablas 5.4.1.2 y 5.4.1.3).

Tabla 5.4.1.2. Valores absolutos de Isoenzimas de LDH y subunidades H y M en los grupos de trasudados

Actividad (U/L)	Cardiaco	Hepático	Valor de p
LDH1	61 ± 48	53 ± 35	NS
LDH2	83 ± 51	57 ± 44	NS
LDH3	49 ± 20	51 ± 30	NS
LDH4	40 ± 27	23 ± 15	NS
LDH5	33 ± 25	26 ± 19	NS
LDH-H	158 ± 95	128 ± 71	NS
LDH-M	108 ± 55	83 ± 35	NS

Valores expresados como media ± DE

Tabla 5.4.1.3. Porcentaje de Isoenzimas de LDH y subunidades H y M en los grupos de trasudados

%	Cardiaco	Hepático	Valor de p
LDH1 %	23 ± 10	25 ± 15	NS
LDH2 %	31 ± 8	35 ± 12	0,10
LDH3 %	19 ± 3	24 ± 7	0,004
LDH4 %	14 ± 7	12 ± 8	NS
LDH5 %	12 ± 8	13 ± 9	NS
LDH-H %	59 ± 10	59 ± 9	NS
LDH-M %	40 ± 10	41 ± 9	NS

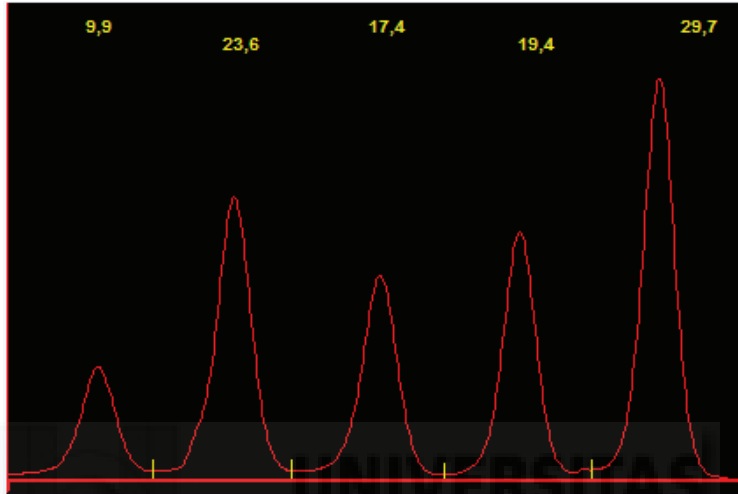
Valores expresados como media ± DE

5.4.2. Exudados

Se clasificaron como exudados un total de 114 (75,5 %) derrames pleurales. Las principales etiologías en este grupo fueron el derrame maligno y el paraneumónico. En este grupo, la electroforesis reveló un mayor porcentaje de

isoenzimas LDH2, LDH5 y subunidades M (Tabla 5.4.2.1). En la imagen (Figura 5.4.2.1) se muestra la electroforesis de un exudado pleural.

Figura 5.4.2.1. Electroforesis de un exudado pleural



El mayor pico corresponde a LDH5.

Tabla 5.4.2.1. Valores absolutos y porcentaje de Isoenzimas de LDH y subunidades H y M de los exudados

Actividad (U/L)	$\bar{x} \pm SD$	Actividad (%)	$\bar{x} \pm SD$
LDH1	125 ± 241	LDH1%	12 ± 6
LDH2	257 ± 438	LDH2%	23 ± 8
LDH3	265 ± 513	LDH3%	19 ± 5
LDH4	288 ± 502	LDH4%	21 ± 6
LDH5	344 ± 641	LDH5%	24 ± 11
LDH-H	522 ± 886	LDH-H%	45 ± 10
LDH-M	758 ± 1306	LDH-M%	55 ± 10

Valores expresados como media ± DE

A continuación se detallan separadamente los patrones electroforéticos que se han obtenido en las principales causas de exudado pleural.

• **Derrames Malignos**

Este grupo incluía un total 60 (53 %) derrames de origen maligno (Tabla 5.4.2.2). La edad media de los paciente fue de 67 años (rango 44 -93) y no se encontraron diferencias en relación con el sexo (32 mujeres y 28 hombres). Como se muestra en la tabla 5.4.2.2, el tipo de tumor primario que con mayor frecuencia afectó a la pleura fue el cáncer de pulmón (38 %) seguido del cáncer de mama (15 %). Entre los tumores de origen digestivo, la causa más frecuente de metástasis pleurales fue con el adenocarcinoma gástrico y el de páncreas. En dos casos no se pudo determinar el origen de la neoplasia primaria.

Tabla 5.4.2.2. Origen de los derrames malignos

Origen	n	%
Pulmonar	23	38,3
Adenocarcinoma	17	
Escamoso	3	
Microcítico	2	
Sarcomatoide	1	
Mama	9	15
Digestivo	9	15
Adenocarcinoma gástrico	3	
Adenocarcinoma páncreas	3	
Adenocarcinoma recto	2	
Adenocarcinoma colon	1	
Renal	7	11,6
Ovario	5	8,3
Hematológico	4	6,6
Linfoma	2	
LLC*	1	
Macroglobulinemia Waldestrom	1	
Mesotelioma	1	1,6
Origen desconocido	2	3,3

*LLC: leucemia linfática crónica

Las características bioquímicas de los derrames malignos se muestran en la tabla 5.4.2.3.

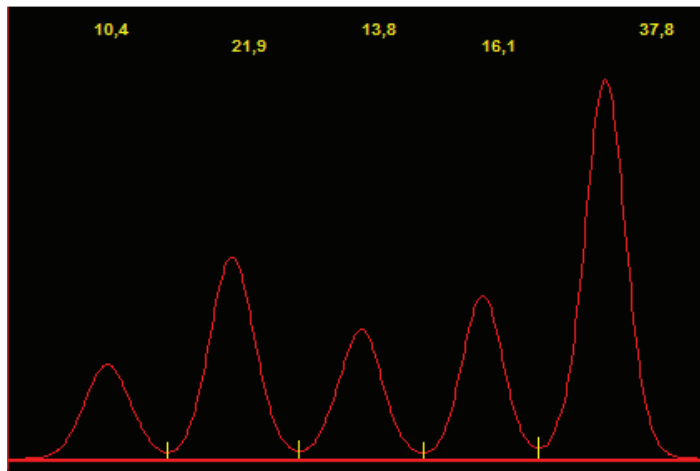
Tabla 5.4.2.3. Características bioquímicas de los derrames malignos

Parámetro	Derrames malignos
pH	7,38 ± 0,83
Glucosa (mg/dL)	110 ± 43
Proteínas (g/dL)	4,18 ± 0,86
LDH (U/L)	967 ± 1020
Hematíes (n/μL)	47603 ± 113592
Leucocitos (n/μL)	2914± 11896

Valores expresados como media ± DE

En este grupo, la electroforesis reveló un perfil isoenzimático en el que predominaba un aumento de la actividad de LDH2, LDH5 y de subunidades M. La figura 5.4.2.2 corresponde al resultado de la electroforesis de un derrame maligno y en la Tabla 5.4.2.4 se muestran los valores de las isoenzimas de LDH y sus subunidades de los derrames de origen neofornativo.

Figura 5.4.2.2. Electroforesis de un derrame maligno



En la electroforesis se observa el mayor pico de LDH5

Tabla 5.4.2.4. Valores absolutos y porcentaje de Isoenzimas de LDH y subunidades H y M de derrames malignos

Actividad (U/L)	x ± SD	Actividad (%)	x ± SD
LDH1	96 ± 72	LDH1%	13 ± 5
LDH2	216 ± 239	LDH2%	25 ± 8
LDH3	207 ± 271	LDH3%	20 ± 5
LDH4	221 ± 264	LDH4%	20 ± 7
LDH5	234 ± 267	LDH5%	23 ± 12
LDH-H	417 ± 425	LDH-H%	46 ± 10
LDH-M	557 ± 614	LDH-M%	54 ± 10

Valores expresados como media y DE

Se analizaron los diferentes patrones electroforéticos según el origen del tumor y su estirpe histológica. No encontramos diferencias significativas entre la estirpe adenocarcinoma (n=37) y no adenocarcinoma (n=23). (Tabla 5.4.2.5 y 5.4.2.6). Tampoco se encontraron diferencias entre las metástasis pleurales por adenocarcinoma de pulmón (n= 17) con el resto de tumores (n=43).

Tabla 5.4.2.5. Valores absolutos de Isoenzimas de LDH y subunidades H y M en adenocarcinoma y no adenocarcinoma

Actividad (U/L)	Adenocarcinoma	No Adenocarcinoma	Valor de p
LDH1	91 ± 69	98 ± 73	NS
LDH2	204 ± 169	221 ± 264	NS
LDH3	211 ± 309	207 ± 271	NS
LDH4	229 ± 168	217 ± 296	NS
LDH5	240 ± 194	231 ± 293	NS
LDH-H	400 ± 268	424 ± 476	NS
LDH-M	562 ± 348	555 ± 696	NS

Valores expresados como media y DE

Tabla 5.4.2.6. Porcentaje de Isoenzimas de LDH y subunidades H y M en adenocarcinoma y no adenocarcinoma

Actividad (U/L)	Adenocarcinoma	No adenocarcinoma	Valor de p
LDH1%	11 ± 5	14 ± 5	0,09
LDH2%	22 ± 9	26 ± 8	NS
LDH3%	20 ± 6	20 ± 5	NS
LDH4%	23 ± 7	19 ± 6	0,07
LDH5%	24 ± 13	22 ± 12	NS
LDH-H%	43 ± 12	47 ± 10	NS
LDH-M%	57 ± 12	53 ± 10	NS

Valores expresados como media y DE

El estudio citológico fue positivo en 28 (46,6 %) casos. La rentabilidad de la citología pleural fue más alta en los casos de los derrames por adenocarcinoma de pulmón. Aunque, encontramos que los derrames que contaban con confirmación citológica presentaron una actividad mayor de LDH5 y LDH-M, estas diferencias no alcanzaron la significación estadística (Tablas 5.4.2.7 y 5.4.2.8).

Tabla 5.4.2.7. Valores absolutos de Isoenzimas de LDH y subunidades H y M en derrames malignos con citología positiva y negativa

Actividad (U/L)	Maligno citología positiva	Maligno citología negativa	Valor de p
LDH1	103 ± 68	90 ± 75	NS
LDH2	254 ± 295	183 ± 175	NS
LDH3	242 ± 328	177 ± 271	NS
LDH4	259 ± 306	187 ± 222	NS
LDH5	274 ± 334	198 ± 188	NS
LDH-H	480 ± 499	362 ± 348	NS
LDH-M	653 ± 743	473 ± 472	NS

Valores expresados como media y DE

Tabla 5.4.2.8. Porcentaje de Isoenzimas de LDH y subunidades H y M en derrames malignos con citología positiva y negativa

Actividad (U/L)	Maligno citología positiva	Maligno citología negativa	Valor de p
LDH1%	12 ± 6	13 ± 5	NS
LDH2%	24 ± 9	25 ± 7	NS
LDH3%	19 ± 6	20 ± 4	NS
LDH4%	21 ± 8	20 ± 6	NS
LDH5%	23 ± 14	23 ± 10	NS
LDH-H%	46 ± 12	46 ± 9	NS
LDH-M%	54 ± 12	53 ± 9	NS

Valores expresados como media y DE

- **Derrame pleural Paraneumónico**

Se diagnosticaron 14 (12 %) derrames de origen infeccioso. Según la clasificación de Light (2013), 10 eran complicados y 4 paraneumónicos no complicados. Sus características bioquímicas se muestran en la tabla 5.4.2.9. En tres casos se obtuvo un cultivo positivo (21 %).

Tabla 5.4.2.9. Características bioquímicas de derrames paraneumónicos

Parámetro	Paraneumónicos
pH	7,29 ± 0,20
Glucosa (mg/dL)	83 ± 52
Proteínas (g/dL)	4,04 ± 0,83
LDH (U/L)	3599 ± 4896
Hematíes (n/μL)	47967 ± 132753
Leucocitos (n/μL)	2769 ± 2014

Valores expresados como media ± DE

En la tabla 5.4.2.10, se detalla el patrón electroforético de todos los derrames de origen infeccioso. Se caracterizaron por presentar una mayor actividad

de LDH4, LDH5 y subunidades M. Las figuras 5.4.2.3 y 5.4.2.4 corresponden a las electroforesis de derrames de origen infeccioso.

Tabla 5.4.2.10. Electroforesis derrames paraneumónicos

Actividad (U/L)	$\bar{x} \pm SD$	Actividad (%)	$\bar{x} \pm SD$
LDH1	327 ± 630	LDH1%	9 ± 5
LDH2	646 ± 1066	LDH2%	19 ± 7
LDH3	701 ± 1123	LDH3%	19 ± 5
LDH4	807 ± 1125	LDH4%	23 ± 4
LDH5	1119 ± 1501	LDH5%	30 ± 12
LDH-H	1363 ± 2100	LDH-H%	38 ± 10
LDH-M	2236 ± 2970	LDH-M%	62 ± 10

Valores expresados en U/L y % como media ± DE

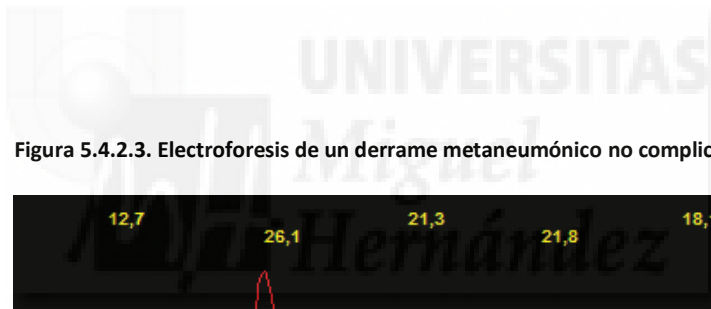
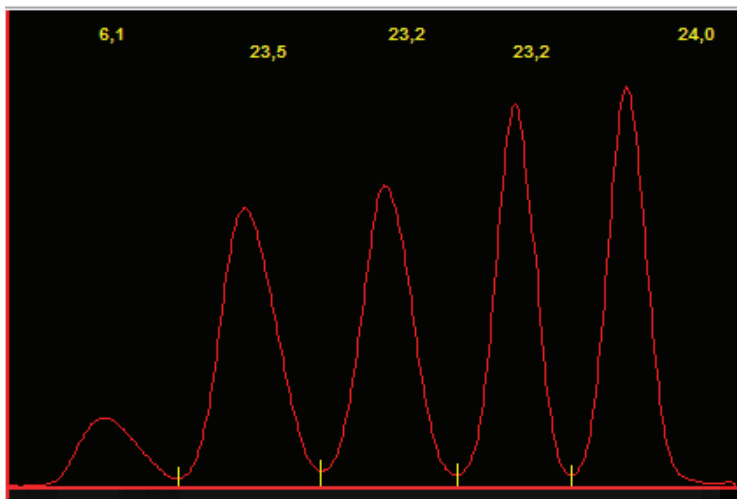


Figura 5.4.2.3. Electroforesis de un derrame metaneumónico no complicado

La electroforesis muestra un predominio de LDH2, LDH3, LDH4 y LDH5

Figura 5.4.2.4. Electroforesis de un derrame metaneumónico no complicado



Electroforesis con pico de LDH2, LDH3, LDH4 y LDH5

Además, se analizaron las características bioquímicas (Tabla 5.4.2.11) y electroforéticas existentes entre los derrames pleurales paraneumónicos complicados y no complicados (Tablas 5.4.2.12 y 5.4.2.13).

Tabla 5.4.2.11. Características bioquímicas de derrames paraneumónicos

Parámetro	DPPNC	DPPC	p
pH	7,39 ± 0,9	7,25 ± 0,22	NS
Glucosa (mg/dL)	133 ± 54	62,8 ± 37	0,01
Proteínas (g/dL)	3,8 ± 0,84	4,13 ± 0,85	NS
LDH (U/L)	486 ± 126	4844 ± 5347	0,03
Hematías (n/μL)	3413 ± 2207	65785 ± 115625	NS
Leucocitos (n/μL)	2031 ± 1094	3064 ± 2263	NS

Valores expresados como media ± DE.

DPPNC: derrame pleural paraneumónico no complicado. DPPC: complicado

Tabla 5.4.2.12. Valores absolutos de Isoenzimas de LDH y subunidades H y M en DPPC y DPPNC

Actividad (U/L)	DPPNC	DPPC	Valor de p
LDH1	50 ± 8	438 ± 724	0,005
LDH2	99 ± 16	864 ± 1207	0,02
LDH3	92 ± 23	944 ± 1262	0,005
LDH4	105 ± 29	1088 ± 1234	0,005
LDH5	139 ± 78	1511 ± 1629	0,005
LDH-H	197 ± 24	1830 ± 2350	0,005
LDH-M	289 ± 107	3015 ± 3221	0,005

Valores expresados en U/L como media ± DE.

DPPNC: derrame pleural paraneumónico no complicado. DPPC: complicado

Tabla 5.4.2.13. Valores relativos de Isoenzimas de LDH y subunidades H y M en DPPC y DPPNC

%	DPPNC	DPPC	Valor de p
LDH1 %	11 ± 3	8 ± 6	NS
LDH2 %	21 ± 5	18 ± 7	NS
LDH3 %	19 ± 4	19 ± 5	NS
LDH4 %	22 ± 2	23 ± 4	NS
LDH5 %	27 ± 9	32 ± 14	NS
LDH-H %	42 ± 7	37 ± 11	NS
LDH-M %	58 ± 7	63 ± 10	NS

Valores expresados en % como media ± DE.

DPPNC: derrame pleural paraneumónico no complicado. DPPC: complicado

- **Derrames inflamatorios e idiopáticos**

En este grupo se incluyeron cuarenta pacientes con edad media de 65 (rango 17-87), veinticuatro mujeres y dieciséis hombres. Se clasificaron como idiopáticos 12 derrames. De estos casos, a cuatro pacientes se les realizó una videotoracoscopia asistida y a los siete pacientes restantes, se les realizó un seguimiento de al menos un año. En las tablas 5.4.2.14 y 5.4.2.15 se muestra la etiología de los derrames así como sus características bioquímicas.

Tabla 5.4.2.14. Etiología de los derrames de origen inflamatorio e idiopático

Etiología	n
Idiopáticos	12
Postquirúrgicos	11
Urémico	3
TEP	3
Pancreatitis	4
Pleuropericarditis	3
Absceso abdominal	2
Artritis reumatoide	1
Exposición asbesto	1
Total	40

Tabla 5.4.2.15. Parámetros bioquímicos de los derrames de origen inflamatorio e idiopático

Parámetro	Exudados
pH	7,41 ± 0,9
Glucosa (mg/dL)	113 ± 33
Proteínas (g/dL)	4,09 ± 1,05
LDH (U/L)	936 ± 1217
Hematías (n/μL)	33746± 90404
Leucocitos (n/μL)	2284 ± 2883

Valores expresados como media ± DE

La electroforesis de este grupo mostró un aumento del porcentaje de LDH2, LDH5 y subunidades M.

Se analizaron los patrones electroforéticos de los distintos grupos diagnósticos que estaban incluidos en este grupo. Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes subgrupos, observamos que la distribución del perfil isoenzimático de determinadas etiologías, presentaba unas características distintas. De tal forma que la electroforesis de los

derrames debidos a enfermedad tromboembólica pulmonar presentaron unos mayores porcentajes de LDH3, LDH4 y LDH5. Los derrames secundarios a pleuritis tuvieron una mayor actividad de LDH2 y LDH4, en los derrames urémicos predominaron LDH2, LDH4 y LDH-H, y en los casos atribuibles a pancreatitis se encontró un aumento de LDH2, LDH3 y LDH4.

5.5 Aportación de las isoenzimas de LDH para la diferenciación de los distintos grupos diagnósticos

5.5.1 Trasudados y exudados

Se ha analizado el patrón electroforético de los trasudados y exudados (Figura 5.5.1.1). El promedio de edad fue mayor en los pacientes con trasudados (75 ± 14 años) respecto a los pacientes con exudados (66 ± 13 años; $p = 0,002$). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la distribución por sexo en ambos grupos (Tabla 5.5.1.1). En las tablas 5.5.1.2 y 5.5.1.3 se muestra el resultado de la electroforesis de los trasudados y exudados.

Figura 5.5.1.1. Trasudados y exudados

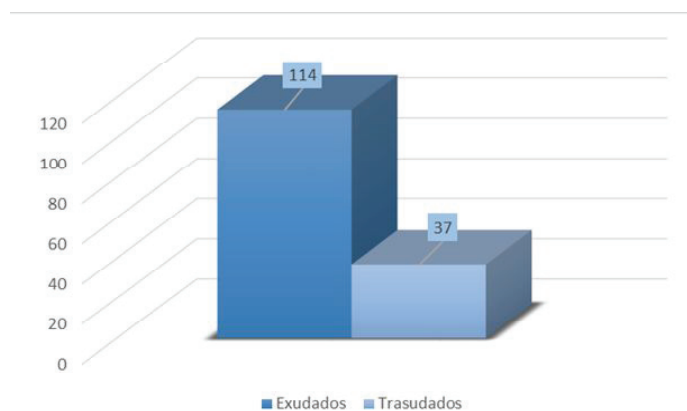


Tabla 5.5.1.1. Relación de los derrames con el sexo de los pacientes

	Sexo	Trasudado	Exudado	Total
	Mujer	14 (20%)	55 (80 %)	69
	Hombre	23 (28 %)	59 (72 %)	82
Total		37	114	151

(p=NS)

Tabla 5.5.1.2. Valores absolutos de Isoenzimas de LDH en trasudados y exudados

Actividad (U/L)	TRASUDADOS	EXUDADOS	Valor de p
LDH1	60 ± 45	125 ± 241	0,10
LDH2	78 ± 51	257 ± 438	0,01
LDH3	50 ± 22	265 ± 513	P < 0,001
LDH4	37 ± 25	288 ± 502	P < 0,001
LDH5	31 ± 23	344 ± 641	P < 0,001
LDH-H	152 ± 90	522 ± 886	P < 0,001
LDH-M	102 ± 52	758 ± 1306	P < 0,001

Valores expresados como media y DE

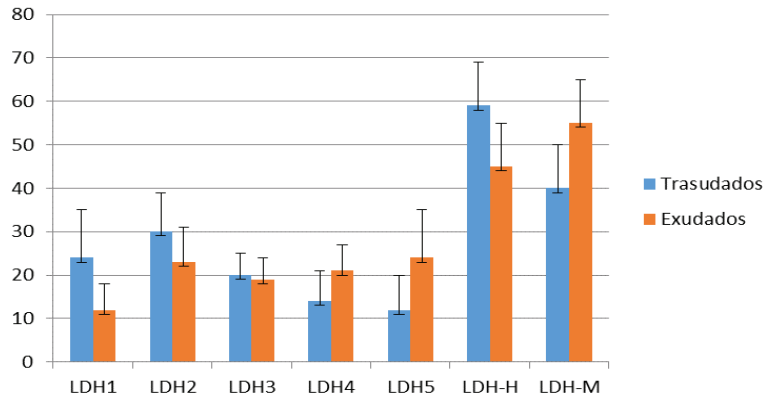
Tabla 5.5.1.3. Porcentaje de Isoenzimas de LDH en trasudados y exudados

%	TRASUDADOS	EXUDADOS	Valor de p
LDH1%	24 ± 11	12 ± 6	P < 0,001
LDH2%	30 ± 9	23 ± 8	P < 0,001
LDH3%	20 ± 5	19 ± 5	NS
LDH4%	14 ± 7	21 ± 6	P < 0,001
LDH5%	12 ± 8	24 ± 11	P < 0,001
LDH-H%	59 ± 10	45 ± 10	P < 0,001
LDH-M%	40 ± 10	55 ± 10	P < 0,001

Valores expresados como media y DE

Observamos que los trasudados y exudados pleurales presentan diferencias significativas en la distribución de las isoenzimas de LDH y sus subunidades. En la figura 5.5.1.2 están representadas las proporciones de las isoenzimas de LDH en estas poblaciones.

Figura 5.5.1.2 Proporciones de isoenzimas LDH \pm SD Trasudados y exudados



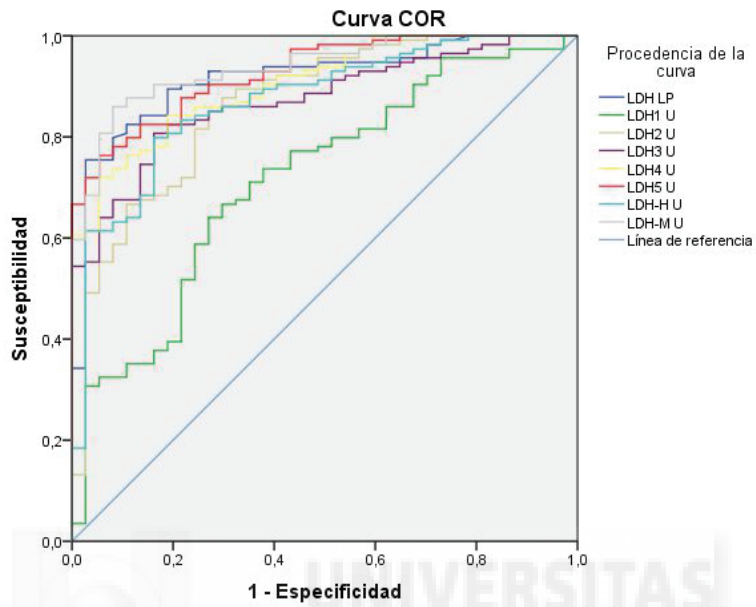
Todas con significación estadística salvo el porcentaje de LDH3

Se calculó las áreas de las curvas (ABC) para las distintas isoenzimas y subunidades H y M, y de sus proporciones (IC 95 %). En la tabla 5.5.1.4 se muestran las ABC y la figura 5.5.1.3 se representan las curvas ROC de todas las isoenzimas para diferenciar exudados de trasudados.

Tabla 5.5.1.4. Área bajo la curva de las isoenzimas de LDH para diferenciar trasudados de exudados

Área bajo la curva	
Variables resultado de contraste	Área
LDH	0,916
LDH1 %	0,148
LDH1 U	0,716
LDH2 %	0,304
LDH2 U	0,865
LDH3 %	0,472
LDH3 U	0,872
LDH4 %	0,744
LDH4 U	0,905
LDH5 %	0,814
LDH5 U	0,927
LDH-H %	0,152
LDH-H U	0,871
LDH-M %	0,856
LDH-M U	0,937

Figura 5.5.1.3. Curvas ROC de isoenzimas LDH para diferenciar trasudados de exudados



En las figuras 5.5.1.4, 5.5.1.5 y 5.5.1.6 están representadas las curvas ROC de LDH4, LDH5 y LDH-M para diferenciar trasudados de exudados que son las que muestran un ABC > 0,90 (IC 95 %).

Figura 5.5.1.4. Curva ROC de LDH4 para diferenciar trasudados de exudados

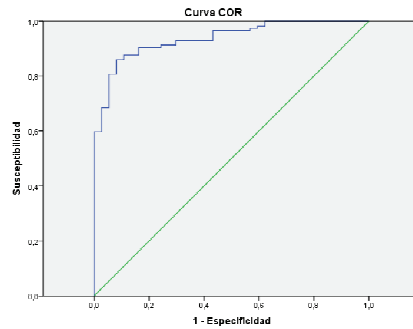


Figura 5.5.1.5. Curva ROC de LDH5 para diferenciar trasudados de exudados

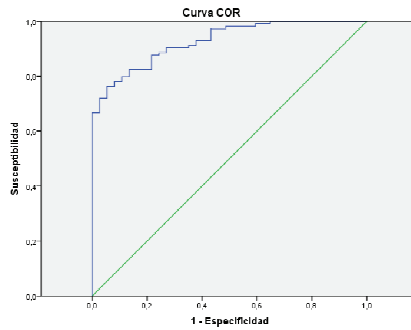
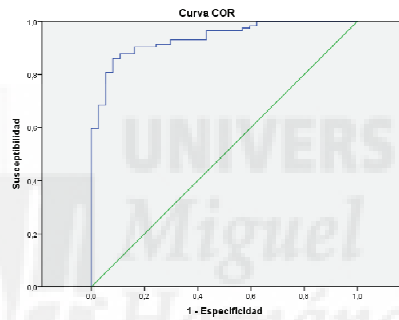


Figura 5.5.1.6. Curva ROC de LDH-M para diferenciar trasudados de exudados



Para diferenciar trasudados de exudados, el parámetro que ha obtenido la mejor ABC para discriminar ambas poblaciones ha sido el valor de la subunidad M de la LDH (ABC = 0,97). Para evaluar la posible utilidad clínica se han analizado los valores de corte que permiten las sensibilidades y especificidades de la prueba superiores al 90 % para diagnosticar trasudados. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 5.5.1.5:

Tabla 5.5.1.5. Rentabilidad de la subunidad M de la LDH para diagnosticar trasudados

Valor LDH-M	Sensibilidad	Especificidad
LDH-M < 125 U/L	76 %	91 %
LDH-M < 160 U/L	92 %	86 %

Estos datos muestran que aunque el valor de la subunidad M de la LDH tiene una gran capacidad para diferenciar trasudados de exudados, su valor diagnóstico global no mejora de forma significativa los descritos con otros parámetros de uso clínico como los criterios de Light. De los 10 trasudados mal clasificados por los criterios de Light, la aplicación de la LDH-M permitía clasificar correctamente el 60 % de ellos.

5.5.2. Derrames benignos y malignos

Se ha analizado la actividad de LDH y sus isoenzimas en los derrames benignos y malignos (Tabla 5.5.2.1). En el grupo de los derrames de origen benigno, el valor de LDH media fue de 1069 ± 2321 U/L y en los derrames de origen malignos 967 ± 1020 U/L. Aunque el valor de LDH fue mayor en los derrames benignos, estas diferencias no fueron significativas. En cambio, encontramos que el perfil isoenzimático sí difería en los derrames benignos y malignos (Tabla 5.5.2.1).

Tabla. 5.5.2.1. Valores absolutos de Isoenzimas de LDH en derrames benignos y malignos

Actividad (U/L)	DERRAMES BENIGNOS	DERRAMES MALIGNOS	Valor de p
LDH1	117 ± 267	96 ± 72	0,02
LDH2	210 ± 463	216 ± 239	0,001
LDH3	216 ± 545	207 ± 271	0,004
LDH4	230 ± 538	221 ± 264	0,005
LDH5	290 ± 706	234 ± 267	0,008
LDH-H	440 ± 955	417 ± 425	0,002
LDH-M	624 ± 1424	557 ± 614	0,002

Valores (U/L) de las isoenzimas en media ± DE

Los derrames malignos contienen una menor proporción de LDH1 y mayor porcentaje de subunidades M (Tabla 5.5.2.2). En el gráfico 5.5.2.1 se han

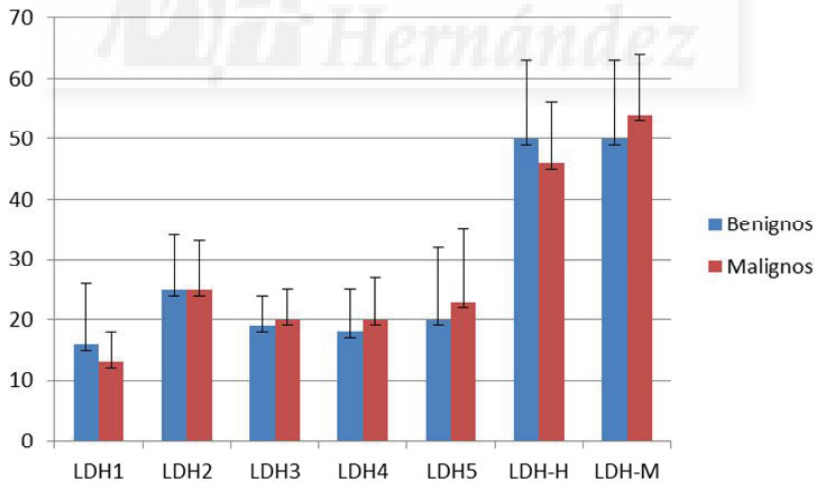
representado las proporciones de las isoenzimas obtenidas entre los derrames benignos y malignos.

Tabla 5.5.2.2. Porcentaje Isoenzimas de LDH en los derrames benignos y malignos

%	DERRAMES BENIGNOS	DERRAMES MALIGNOS	Valor de p
LDH1%	16 ± 10	13 ± 5	0,003
LDH2%	25 ± 9	25 ± 8	NS
LDH3%	19 ± 5	20 ± 5	NS
LDH4%	18 ± 7	20 ± 7	0,10
LDH5%	20 ± 12	23 ± 12	NS
LDH-H%	50 ± 13	46 ± 10	0,06
LDH-M%	50 ± 13	54 ± 10	0,04

Valores (U/L) de las isoenzimas en media ± DE

Figura 5.5.2.1. Porcentaje de isoenzimas de LDH en los derrames benignos y malignos



Significación estadística en el porcentaje de LDH1 y LDH-M

Se determinaron el ABC de los resultados que presentaron mayores diferencias (Figura 5.5.2.2). Las mejores áreas bajo la curva que se obtuvieron fue de 0,661, 0,629 y 0,650 (IC del 95 %) para LDH2, LDH5 y LDH-M respectivamente para diagnosticar derrames malignos (Tabla 5.5.2.3).

Figura 5.5.2.2. Curvas ROC correspondientes a LDH2, LDH5 y LDH-M para diferenciar derrames malignos

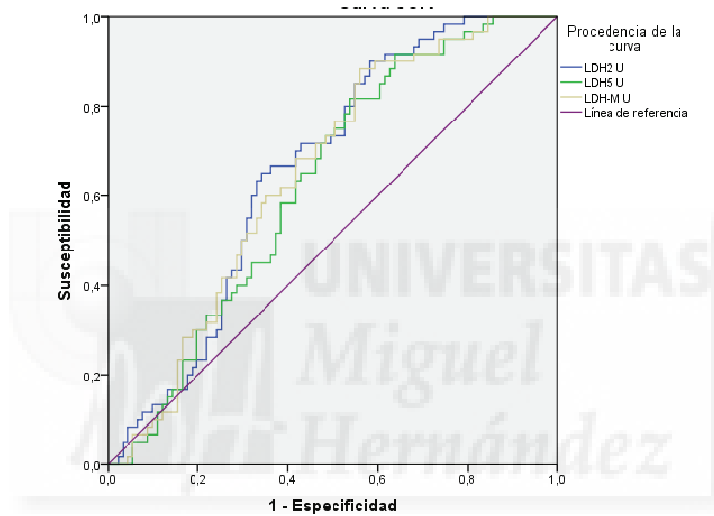


Tabla 5.5.2.3. Área bajo la curva de LDH2, LDH5 y LDH-M para diferenciar derrames malignos

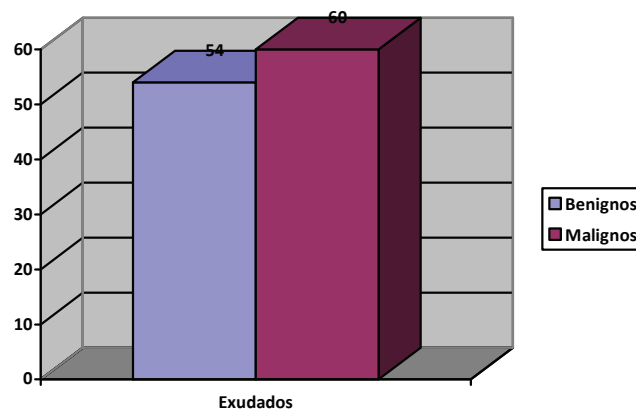
Área bajo la curva	
Variables resultado de contraste	ABC
LDH2 U	0,661
LDH5 U	0,629
LDH-M U	0,65

Para un punto de corte de LDH2 superior a 145 U/L se obtuvo una sensibilidad de 55 % y una especificidad de 70 %. Empleando un valor de LDH por encima de 205 U/L, la sensibilidad fue de 25 % y la especificidad de 78 % respectivamente. Estos resultados no permiten establecer una adecuada diferenciación entre derrames benignos y malignos.

5.5.3. Exudados benignos y malignos

Un total de 114 derrames fueron clasificados como exudado, de los cuales 54 (47,4 %) tenían un origen benigno y 60 (52,6%) un origen maligno (Figura 5.5.3.1). Se ha analizado la actividad de LDH y sus isoenzimas en ambos grupos de exudados (Tabla 5.5.3.1). Los exudados de origen benigno, se obtuvo un valor de LDH media de 1627 ± 2890 U/L y en los derrames de origen malignos 967 ± 1020 U/L. Aunque el valor de LDH fue mayor en los derrames benignos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Figura 5.5.3.1. Exudados de origen benigno y maligno



En las tablas 5.5.3.1 y 5.5.3.2 se detallan los valores de las isoenzimas de LDH y sus proporciones de los derrames exudativos benignos y malignos. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, los exudados de origen los exudados de origen maligno mostraron mayor porcentaje de LDH2.

Tabla 5.5.3.1. Valores de Isoenzimas de LDH en exudados benignos y malignos

Actividad (U/L)	EXUDADOS BENIGNOS	EXUDADOS MALIGNOS	Valor de p
LDH1	157 ± 341	96 ± 72	NS
LDH2	302 ± 585	216 ± 239	NS
LDH3	330 ± 687	207 ± 271	NS
LDH4	364 ± 669	221 ± 264	NS
LDH5	467 ± 876	234 ± 267	0,06
LDH-H	639 ± 1202	417 ± 425	NS
LDH-M	980 ± 1766	557 ± 614	0,09

Tabla...Valores (U/L) de las isoenzimas en media ± DE

Tabla 5.5.3.2. Porcentaje Isoenzimas de LDH en exudados benignos y malignos

%	EXUDADOS BENIGNOS	EXUDADOS MALIGNOS	Valor de p
LDH1%	12 ± 6	13 ± 5	NS
LDH2%	22 ± 8	25 ± 8	0,09
LDH3%	19 ± 5	20 ± 5	NS
LDH4%	21 ± 6	20 ± 7	NS
LDH5%	26 ± 11	23 ± 12	NS
LDH-H%	43 ± 10	46 ± 10	NS
LDH-M%	57 ± 10	54 ± 10	NS

Valores expresados como media ± DE

Como hemos visto previamente, la rentabilidad de la citología en los derrames malignos fue del 46,6 %. En este apartado, analizamos la aportación de las isoenzimas de LDH para diferenciar exudados benignos (n=54) de los derrames

malignos que no se habían confirmado por citología (n=32). En las tablas 5.5.3.3 y 5.5.3.4 se detallan la composición isoenzimática de estos grupos y sus diferencias.

Tabla 5.5.3.3. Valores de Isoenzimas de LDH en exudados benignos y malignos con citología negativa

Actividad (U/L)	EXUDADOS BENIGNOS	MALIGNOS CITOLOGIA NEGATIVA	Valor de p
LDH1	157 ± 341	90 ± 75	NS
LDH2	302 ± 585	183 ± 175	NS
LDH3	330 ± 687	177 ± 271	NS
LDH4	364 ± 669	187 ± 222	0,07
LDH5	467 ± 876	198 ± 188	0,03
LDH-H	639 ± 1202	362 ± 348	NS
LDH-M	980 ± 1766	473 ± 472	0,05

Valores (U/L) de las isoenzimas en media ± DE

Tabla 5.5.3.4. Porcentaje Isoenzimas de LDH en exudados benignos y malignos con citología negativa

%	EXUDADOS BENIGNOS	MALIGNOS CITOLOGIA NEGATIVA	Valor de p
LDH1%	12 ± 6	13 ± 5	NS
LDH2%	22 ± 8	25 ± 7	NS
LDH3%	19 ± 5	20 ± 4	NS
LDH4%	21 ± 6	20 ± 6	NS
LDH5%	26 ± 11	23 ± 10	NS
LDH-H%	43 ± 10	46 ± 9	NS
LDH-M%	57 ± 10	53 ± 9	NS

Valores expresados como media ± DE

Al comparar estos grupos hemos encontrado que los exudados de origen benigno contienen valores más altos de LDH5 y subunidades M ($p < 0,05$) que los exudados malignos que tenían un resultado negativo en la citología.

5.5.4. Exudados infecciosos y malignos

Cuando comparamos los derrames de origen infeccioso y neofornativo, se observó que el grupo de los derrames pleurales paraneumónicos tenían una actividad total de LDH significativamente más alta que los derrames malignos (Tabla 5.5.4.1)

Tabla 5.5.4.1. Características bioquímicas de derrames paraneumónicos y malignos

Parámetro	Paraneumónicos	Malignos	p
pH	7,29 ± 0,20	7,38 ± 0,8	NS
Glucosa (mg/dL)	83 ± 52	110 ± 43	0,04
Proteínas (g/dL)	4,04 ± 0,83	4,18 ± 0,87	NS
LDH (U/L)	3599 ± 4896	967 ± 1020	0,008
Hematíes (n/μL)	47967 ± 132753	47603 ± 113592	NS
Leucocitos (n/μL)	2769 ± 2014	2915 ± 11896	NS

Valores expresados como media ± DE

Además, encontramos que las isoenzimas de LDH tenían composiciones significativamente diferentes entre ambos tipos de derrames. Los resultados del perfil isoenzimático se detallan en las tablas 5.5.4.2 y 5.5.4.3.

Tabla 5.5.4.2. Isoenzimas de LDH y subunidades H y M en los exudados infecciosos y malignos

	EXUDADOS INFECCIOSOS	EXUDADOS MALIGNOS	Valor de p
LDH1	327 ± 630	96 ± 72	NS
LDH2	646 ± 1066	216 ± 239	NS
LDH3	701 ± 1123	207 ± 271	0,01
LDH4	807 ± 1125	221 ± 264	0,004
LDH5	1119 ± 1501	234 ± 267	0,002
LDH-H	1363 ± 2100	417 ± 425	0,02
LDH-M	2236 ± 2970	557 ± 614	0,004

Valores (U/L) de las isoenzimas en media ± DE

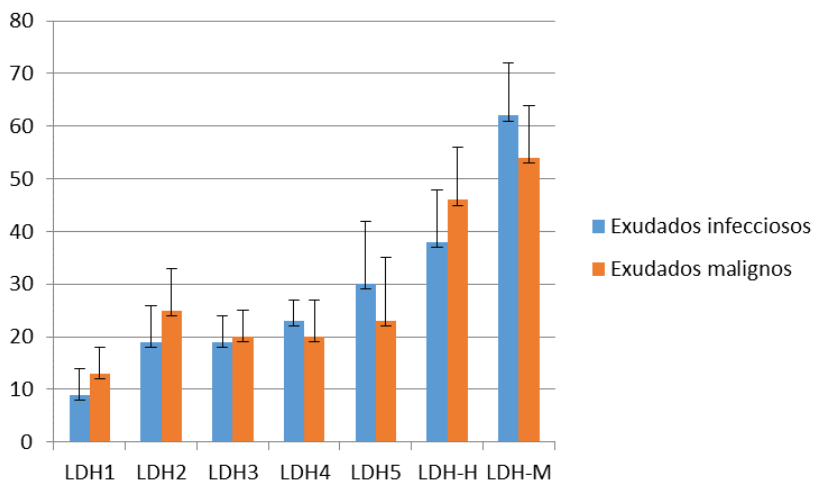
Tabla 5.5.4.3. Porcentaje Isoenzimas de LDH y subunidades H y M en exudados infecciosos y malignos

%	EXUDADOS INFECCIOSOS	EXUDADOS MALIGNOS	Valor de p
LDH1%	9 ± 5	13 ± 5	0,01
LDH2%	19 ± 7	25 ± 8	0,008
LDH3%	19 ± 5	20 ± 5	NS
LDH4%	23 ± 4	20 ± 7	0,10
LDH5%	30 ± 12	23 ± 12	0,02
LDH-H%	38 ± 10	46 ± 10	0,01
LDH-M%	62 ± 10	54 ± 10	0,01

Porcentaje en media ± DE de isoenzimas de LDH

Por tanto, observamos que los derrames paraneumónicos presentan un mayor porcentaje de LDH5 y LDH-M ($p < 0,05$) respecto al grupo de derrames malignos. En cambio, en los derrames malignos la proporción de LDH1, LDH2 y subunidades H fue significativamente superior. En la figura 5.5.4.1 están representadas la media del porcentaje de las isoenzimas y subunidades H y M.

Figura 5.5.4.1. Promedio de isoenzimas LDH ± SD en exudados infecciosos y malignos



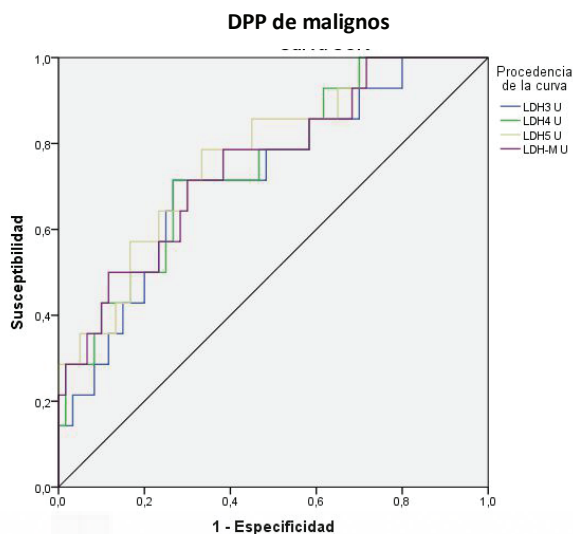
Se calcularon las curvas ROC para las diferentes isoenzimas y subunidades H y M, y de sus proporciones (IC 95 %). En la tabla 5.5.4.4 se muestran las áreas de las curvas ROC de los valores obtenidos.

Tabla 5.5.4.4. ABC de las isoenzimas de LDH para diferenciar derrames infecciosos de malignos

Área bajo la curva	
Variabes resultado de contraste	Área
LDH	0,730
LDH1 %	0,293
LDH1 U	0,636
LDH2 %	0,270
LDH2 U	0,636
LDH3 %	0,498
LDH3 U	0,721
LDH4 %	0,640
LDH4 U	0,748
LDH5 %	0,693
LDH5 U	0,771
LDH-H %	0,289
LDH-H U	0,690
LDH-M %	0,711
LDH-M U	0,751

En la figura 5.5.4.2 se representan las curvas ROC de LDH y las isoenzimas LDH3 LDH4, LDH5 y LDH-M para diferenciar derrames de origen metaneumónico de maligno, que son las que mostraron la mejor ABC.

Figura 5.5.4.2. Curvas ROC correspondientes a LDH, LDH3, LDH4, LDH5 y LDH-M para diferenciar



5.6. Relación con los hematíes y las células nucleadas del líquido pleural

Se ha estudiado la existencia de una posible relación entre la actividad de LDH y sus isoenzimas con las células del líquido pleural. Para establecer una posible relación de la actividad total de LDH, LDH1 y las subunidades H con el número de hematíes del líquido pleural, comparamos los valores obtenidos entre aquellos líquidos que contenían menos de 10.000 hematíes/ μ (n=107) y aquellos con igual o más de 10000 hematíes/ μ (n= 44). En la tabla 5.6.1 se detallan los valores obtenidos en ambos grupos.

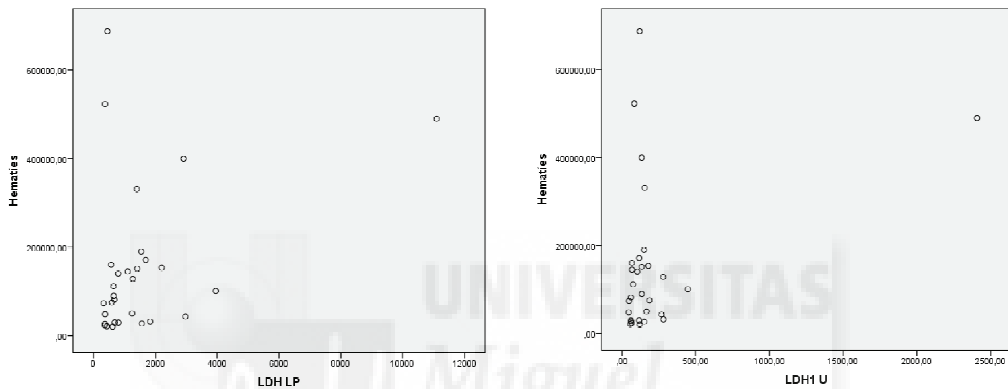
Tabla 5.6.1. Valores absolutos de LDH, LDH1 y LDH-H y el número de hematíes

Actividad (U/L)	<10.000/mm ³	≥ 10.000/mm ³	Valor de p
LDH	900 ± 1972	1319 ± 1732	0,001
LDH1	83 ± 101	172 ± 355	0,001
LDH-H	363 ± 734	598 ± 889	0,001

Valores expresados en U/L como media ± DE

Además, se encontró una correlación significativa aunque débil, de LDH ($r = 0,458$) y de la subunidad LDH1 ($r = 0,416$) con el número de hematíes de todos los derrames analizados (Figura 5.6.1).

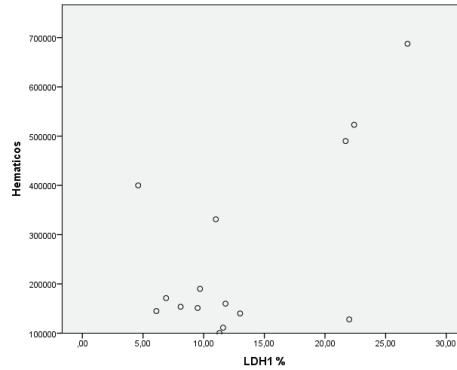
Figura 5.6.1. Relación entre en número de hematíes con LDH y LDH1



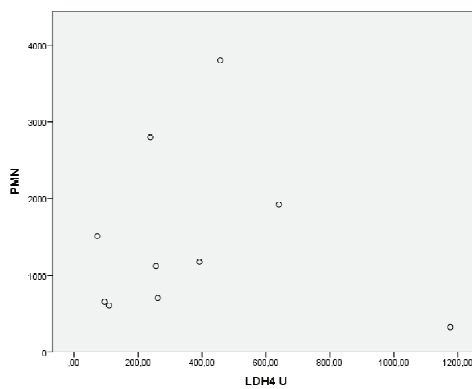
($p < 0,001$)

En los líquidos que contenían más de 10.000 hematíes, se encontró una débil relación, aunque significativa, entre el número de hematíes del líquido pleural y la actividad total de LDH ($r = 0,359$) y las subunidades LDH1 ($r = 0,387$) y LDH-H ($r = 0,354$). En cambio, cuando analizamos los líquidos que contenían más de 100.000 hematíes/mm³ ($n = 15$), se evidenció una relación significativa entre la concentración pleural de hematíes y con el porcentajes de subunidades LDH1 ($r = 0,628$; $p = 0,012$) (Figura 5.6.2).

Figura 5.6.2. Relación entre en número de hematíes (>100.000/ μ) y LDH1 %



Estudiamos la relación de las células nucleadas del líquido pleural con la distribución de isoenzimas de LDH. Encontramos una relación significativa entre el número de leucocitos del líquido pleural y los valores de LDH4 ($r=0,590$; $p<0,001$) LDH5 ($r=0,534$; $p<0,001$) y LDH-M ($r=0,582$; $p<0,001$). En los derrames que presentaban un predominio linfocitario ($n=121$; 80 %), se obtuvo una relación significativa con los niveles de LDH3 ($r=0,505$; $p<0,001$) LDH4 ($r=0,571$; $p<0,001$) y LDH-M ($r=0,576$; $p<0,001$). Sin embargo, cuando estudiamos los líquidos que presentaban un predominio poliformonuclear, únicamente se encontró una relación significativa de los leucocitos polimorfonucleares en el grupo de pacientes con derrame pleural paraneumónico complicado (Figura 5.6.3).

Figura 5.6.3. Relación de LDH4 con PMN*

*PMN (Polimorfonucleares): n/μL

En el grupo de derrames pleurales paraneumónicos complicados se obtuvo una relación de la actividad de LDH4 ($r=0,638$; $p= 0,04$) y del porcentaje de subunidades M ($r= 0,705$; $p=0,02$) con el número de leucocitos polimorfonucleares.



DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Este estudio ha permitido definir, tras una evaluación prospectiva, sistemática y siguiendo rigurosos criterios metodológicos, la diferente composición de isoenzimas de LDH en función de la causa del derrame pleural y sus posibles aportaciones diagnósticas frente a los resultados inconcluyentes de estudios previos. La determinación de la actividad de LDH en líquido pleural es de gran utilidad clínica. Aporta información imprescindible, por ejemplo, para poder distinguir los trasudados de los exudados pleurales o para clasificar a los derrames metaneumónicos en función del riesgo de complicaciones. Esta enzima está compuesta por cuatro cadenas de péptidos de dos tipos (M y H) que se combinan dando lugar a sus cinco isoenzimas. Esto ha dado lugar a diversos estudios que han intentado evaluar la composición de isoenzimas de LDH en distintas situaciones clínicas y su posible aplicación, con resultados muchas veces contradictorios. Muchos de estos estudios incluían un número reducido de pacientes, o seleccionaban un escaso número de causas de derrame pleural. Era necesario, por tanto, realizar un análisis que incluyera un número suficiente de derrames pleurales conforme a los criterios más exigentes de evaluación diagnóstica.

En este trabajo se ha podido establecer la descripción pormenorizada de la composición de isoenzimas de LDH en las distintas causas de derrames pleural y, además, se ha podido realizar un análisis detallado para evaluar su posible valor para discriminar los diferentes grupos diagnósticos. Las propias características de los grupos diagnósticos (trasudados frente a exudados, benignos frente a malignos, etc.) hacen conveniente presentar la discusión en diversos apartados que, aunque necesariamente interrelacionados, facilitan la aproximación crítica a los resultados.

En el presente trabajo, mediante electroforesis en gel de agarosa, se han separado las cinco formas isoenzimáticas de LDH y se han calculado las

proporciones de las subunidades H y M en función de la composición de las isoenzimas. Para su determinación, se necesitan pequeñas muestras y es un método rápido, fácil y económico en contraste con otras técnicas. Un aspecto especialmente novedoso en este trabajo ha sido el estudio de la composición de isoenzimas en función de las subunidades H y M en el derrame pleural de diferente etiología. La aportación de las subunidades H y M en el líquido pleural sólo había sido reportada en un trabajo que incluía pacientes con derrame pleural maligno (Nevin *et al.*, 1988). En nuestra serie, además del análisis de las isoenzimas de LDH, se ha estudiado la composición y aportación de las subunidades H y M en los distintos grupos diagnósticos incluidos. Este hecho permite un conocimiento más extenso de la distribución de las isoenzimas en el derrame pleural y su aportación al estudio de las enfermedades pleurales.

Las causas más frecuentes de derrame pleural en nuestro estudio fueron el derrame pleural maligno, la insuficiencia cardíaca y la neumonía. Estos resultados, coinciden con los publicados en las principales series españolas aunque con distintas proporciones (Villena *et al.*, 2002; Porcel *et al.*, 2014), de modo que el porcentaje de trasudados en nuestra serie se asemeja a series procedentes de Medicina Interna (Porcel *et al.*, 2014). Es probable que el mayor número de trasudados que se encuentran en este estudio se deba a que a la mayor parte de los pacientes a los que se les practica una toracocentesis diagnóstica en nuestro hospital es realizada en el Servicio de Neumología.

Nuestro trabajo aporta los resultados, de la serie más amplia hasta el momento, que demuestran que la composición de isoenzimas de LDH en el líquido pleural difiere de su distribución en suero y en función del diagnóstico del derrame pleural. En suero se ha demostrado que existe un predominio de isoenzimas LDH1 y LDH2 (Drent *et al.*, 1996). En el presente trabajo, encontramos que la electroforesis de todos los líquidos pleurales analizados presentó un predominio de LDH2, LDH5 y subunidades M. De modo que, coincidiendo con otros autores (Paavonen *et al.*,

1991), en el líquido pleural existe un predominio de isoenzimas más anaeróbicas que las que componen el suero. Paavonen y col (1991) sugieren que las células epiteliales pleurales podrían ser las responsables de sintetizar isoenzimas anaeróbicas en el líquido pleural, independientemente del origen benigno o maligno del derrame.

Isoenzimas de LDH en trasudados pleurales

Se ha observado que la composición de isoenzimas en los trasudados pleurales es un reflejo del patrón electroforético del suero (Vergnon *et al.*, 1984, Cobben *et al.*, 1997). En nuestro estudio, coincidiendo con estos autores, encontramos que los trasudados presentan una distribución de isoenzimas con un predominio de LDH1 y LDH2, y subunidades H. Estos resultados coinciden con el trabajo de Light y Ball (1973), que al igual que otros autores, encuentran un patrón isoenzimático similar con un predominio de subunidades LDH1 y LDH2 (Richerich *et al.*, 1963; Cobben *et al.*, 1997). A diferencia de los trabajos publicados que sólo incluyeron trasudados de origen cardiaco (Light *et al.*, 1973; Vergnon *et al.*, 1983; Lossos *et al.*, 1995), hemos estudiado la composición de isoenzimas entre las principales causas de trasudado. Hemos encontramos que el hidrotórax hepático presenta un porcentaje significativamente superior de LDH3. Si bien el número de pacientes con hidrotórax de origen hepático es pequeño (6 casos), es la primera vez que se describe la composición de isoenzimas de LDH en trasudados de una etiología distinta a la insuficiencia cardiaca, por tanto no hemos podido comparar este resultado en líquido pleural. Sin embargo, se ha observado un aumento de LDH3 en suero de pacientes con hepatitis de origen viral (Rotenberg *et al.*, 1990) y en suero de ratones cuando se les inducía un daño hepático inducido por policlorocamfeno (Kuz'minskaya UA *et al.*, 1976). Sin embargo, otros autores encuentran valores incrementados de LDH3 en líquido ascítico de pacientes con peritonitis bacteriana espontánea y con ascitis maligna (Sevinc *et al.*, 2005).

Isoenzimas en exudados pleurales

El perfil isoenzimático de los exudados pleurales es diferente a la distribución de isoenzimas en suero. Encontramos que los exudados presentan un patrón isoenzimático característico con un predominio de LDH2, LDH5 y subunidades M. En la literatura, se han descrito diferencias en la composición de isoenzimas entre las principales causas de exudado pleural: derrames malignos, de origen infecciosos y en exudados pleurales de origen benigno (Light et al., 1973; Vergnon et al., 1984; Cobben et al., 1997), sin embargo no hemos encontrado descripciones sobre la composición de isoenzimas de LDH cuando se contemplan todas las causas de exudados pleurales.

En nuestra serie, el derrame pleural maligno resultó la causa más frecuente de exudado pleural. En este grupo, el origen más frecuente fue el adenocarcinoma de pulmón. Nuestro trabajo contiene una de las series más amplias de derrames malignos a los que se les ha determinado isoenzimas de LDH en líquido pleural. La electroforesis en estos derrames reveló un patrón caracterizado por una máxima actividad de LDH2, LDH5 y subunidades M, y una actividad baja de LDH1. Nuestros resultados coinciden con trabajos previamente publicados. Vergnon y cols (1984) encontraron un aumento de LDH5 en los derrames malignos incluidos en su estudio con excepción de los linfomas y los carcinomas microcíticos. Richterich y Burger (1963) encontraron que los derrames malignos contenían más LDH4 y LDH5. Posteriormente Cobben y cols, obtuvieron resultados similares en 41 derrames malignos que incluyeron en su estudio. En consecuencia, al existir un predominio de las isoenzimas LDH4 y LDH5, indica un predominio de subunidades M. En este sentido, nuestros resultados coinciden también con los de Nevin y Mulholland (1988). Estos autores encontraron una relación de las subunidades M con el origen maligno de los derrames. En cuanto a la relación con la estirpe tumoral, coincidiendo con otros autores, no hemos encontrado una relación de las isoenzimas de LDH con la estirpe histológica (Light et al., 1973; Cobben et al., 1997).

Cuando analizamos el grupo constituido por derrames pleurales paraneumónicos, la distribución de isoenzimas reveló un aumento de LDH4, LDH5 y subunidades M. Cuando comparamos los parámetros clásicos en los derrames paraneumónicos complicados y no complicados, los valores de glucosa y LDH mostraron diferencias significativas entre ambos grupos. Como hemos visto, una característica de los derrames metaneumónicos complicados es el valor muy elevado de la LDH. Sin embargo, no se ha establecido previamente si esta elevación se debe a todas las isoenzimas de LDH o se debe a algún tipo concreto de estas. Vergnon y col (1984) encontraron que en los empiemas se incrementaban los valores relativos de las isoenzimas en líquido pleural. En nuestro estudio hemos podido comprobar que, la elevación de la LDH en los derrames complicados se realiza manteniendo una proporción similar de las isoenzimas que se observan en el derrame metaneumónico no complicado, sin que predominen, de forma significativa, unas sobre otras. Otro hallazgo interesante en el grupo de derrames paraneumónicos complicados es la relación de la actividad de LDH4 y del porcentaje de subunidades M con el número de leucocitos polimorfonucleares. Se ha sugerido en la literatura, que el incremento de LDH4 y LDH5 podría deberse al elevado número de polimorfonucleares presentes en derrames que cursan con una marcada inflamación pleural (Light et al., 1973; Vergnon *et al.*, 1984). Sin embargo, es la primera vez que esta asociación se establece con los derrames paraneumónicos complicados.

La ausencia de derrames tuberculosos resulta destacable en este trabajo, en parte debido a la baja prevalencia de la enfermedad en nuestra área. Además, se ha realizado un examen exhaustivo de las bases de datos epidemiológicas y microbiológicas de nuestra área que confirman la ausencia de derrames pleurales tuberculosos. Dos casos que constan como tuberculosis pleural correspondían a un paciente con afectación pleural nodular y escasa cantidad de líquido pleural al que no se pudo extraer líquido para su análisis y cuyo diagnóstico se realizó tras la

demostración de granulomas necrotizantes en la biopsia pleural obtenida mediante videotoracoscopia. El único caso de derrame pleural tuberculoso fue estudiado por otro servicio y no pudo incluirse en el presente trabajo.

Cuando comparamos el perfil isoenzimático de los derrames malignos e infecciosos, observamos que los derrames paraneumónicos contienen una actividad total de LDH significativamente mayor que los derrames de origen malignos. Además, encontramos que la composición de sus isoenzimas presenta diferencias significativas entre ambos grupos, de modo que los derrames metaneumónicos contienen una mayor proporción de LDH5 y subunidades M. Estos hallazgos, no coinciden con los de Cobben y cols, a pesar de que estos autores encuentran que el patrón de isoenzimas de LDH difiere entre derrames infecciosos y malignos. Sin embargo, a diferencia de nuestros resultados, observan que son los derrames de origen maligno los que presentan una mayor proporción de LDH4 y LDH5. Además, en su trabajo, los niveles de LDH no mostraron diferencias entre ambas poblaciones, en consecuencia, no obtuvieron diferencias en los valores absolutos de las isoenzimas de LDH que permitiese discriminar entre estos grupos (Cobben *et al.*, 1997).

Entre las distintas causas de derrames que componían el grupo de exudados benignos incluidos, el patrón electroforético reveló un aumento del porcentaje de LDH2, LDH5 y subunidades M. A pesar de no encontrar diferencias significativas, la distribución de isoenzima de LDH difería en determinadas etiologías. De tal forma que los derrames secundarios a pleuritis (origen viral o lúpica) tuvieron una mayor actividad de LDH2 y LDH4, en los derrames urémicos predominaron LDH2, LDH4 y LDH-H, en los casos atribuibles a pancreatitis se encontró un aumento de LDH2, LDH3 y LDH4 y la electroforesis de los derrames debidos a enfermedad tromboembólica pulmonar presentaron unos mayores porcentajes de LDH3, LDH4 y

LDH5. En este sentido, existen estudios que sugieren que el aumento de la actividad de LDH3 traduce una lesión pulmonar aguda (Drent *et al.*, 1996; Ben *et al.*, 2007) de modo que se puede incrementar en pacientes con embolia pulmonar lo que podría explicar el aumento de LDH3 en el derrame de los pacientes con enfermedad tromboembólica.

Para la diferenciación entre exudados de origen benigno y maligno, se ha descrito que la proporción de LDH2 se encuentra aumentada en los exudados malignos, con una reducción de LDH4 y LDH5 respecto a los exudados benignos (Light *et al.*, 1973). Los resultados de nuestra serie, de una forma similar, mostraron que los exudados malignos presentan una mayor proporción de LDH2, aunque las diferencias encontradas no alcanzaron significación estadística.

Isoenzimas para diferenciar trasudados de exudados

En el enfoque diagnóstico inicial del derrame pleural, el primer paso consiste en separar a los derrames pleurales en dos grandes grupos, trasudados y exudados. Esta separación conlleva enormes ventajas a la hora de realizar una aproximación diagnóstica, debido a que obedecen a mecanismos fisiopatológicos diferentes y tendrán una aproximación distinta al diagnóstico etiológico. Sin embargo, con los criterios de Light (Light *et al.*, 1972), debido a su baja especificidad, se clasifican erróneamente como exudados entre un 17 % y un 30 % de pacientes con trasudado pleural. Además solo aportan información sobre la naturaleza del derrame y no sobre su etiología. Como hemos visto, al analizar el perfil isoenzimático en estos casos, encontramos que los trasudados y exudados pleurales se caracterizan por presentar una diferente composición en cuanto a la distribución de las isoenzimas de LDH y sus subunidades.

Al comparar la composición de isoenzimas entre exudados y trasudados, como en estudios previos (Cobben *et al.*, 1997), obtuvimos diferencias significativas que permitían diferenciar ambas poblaciones. El parámetro que ha obtenido la mejor área bajo la curva ROC es el valor de la subunidad M de la LDH. Para un valor de LDH-M menor de 125 U/L presenta una sensibilidad del 76 % y especificidad del 91 % para diagnosticar trasudados. Al aplicar un valor de corte de LDH-M menor de 160 U/L, se obtiene una sensibilidad del 92 % y una especificidad del 86 %. Estos datos muestran que aunque el valor de la subunidad M de la LDH tiene una gran capacidad para diferenciar trasudados de exudados, su valor diagnóstico global no mejora de forma significativa los descritos con otros parámetros de uso clínico como los criterios de Light.

Un problema clínico frecuente es la clasificación incorrecta de los trasudados pleurales como exudados, lo que da lugar a exploraciones innecesarias con los consiguientes riesgos para el paciente y aumento de costes. Por este motivo se han evaluado diversos parámetros para intentar dar respuesta a este problema de forma específica; los que han mostrado mayor utilidad han sido el gradiente de proteínas y el gradiente de albúmina (Roth *et al.*, 1999; Romero-Candeira *et al.*, 2002). Como hemos visto, nuestros datos muestran un resultado de especial interés, la determinación de la subunidad M de LDH permite clasificar correctamente el 60 % de los trasudados mal clasificados con los criterios clínicos habituales. Este dato tiene una aplicabilidad clínica potencial de gran valor, podría determinarse la LDH-M en casos de sospecha clínica de existencia de un trasudado mal clasificado o en las determinaciones de los derrames pleurales en tratamiento con diuréticos (origen de la mayoría de estos casos). No obstante, sería conveniente incluir su determinación en el analizador convencional del laboratorio para poder disponer de su resultado de forma rápida en la práctica asistencial.

Isoenzimas de LDH para diferenciar derrames benignos de malignos

Con frecuencia, establecer un diagnóstico del derrame pleural representa un problema en la práctica clínica, especialmente en la diferenciación entre patologías benignas y malignas. Esta distinción es de especial importancia puesto que conlleva implicaciones terapéuticas y pronósticas diferentes. Sin embargo, no siempre es posible establecer una completa distinción entre derrames benignos y malignos, incluso es preciso realizar exploraciones invasivas no exentas de riesgo para lograr obtener un diagnóstico de certeza. En nuestra serie, la actividad total de la LDH, a pesar de presentar un valor más elevado en los derrames de origen benigno, esta diferencia no alcanzó significación estadística que permitiese discriminar entre ambos grupos. Al estudiar el papel de las isoenzimas de LDH y sus subunidades para distinguir estas poblaciones, encontramos que la composición de isoenzimas de LDH y subunidades H y M sí presentan diferencias entre los derrames malignos y benignos. De modo que los derrames malignos contienen una menor proporción de LDH1 y mayor porcentaje de subunidades M. El aislamiento electroforético discrimina entre LDH1 y LDH2, isoenzimas aeróbicamente activas y LDH4 y LDH5, isoenzimas anaeróbicamente activas. De tal forma que, durante el proceso de transformación maligna se ha sugerido que las células obtienen su energía a través de procesos anaeróbicos. En este sentido, se ha descrito que los derrames malignos contienen más LDH4 y LDH5 y los benignos presentan un perfil isoenzimático similar al suero (Richterich *et al.*, 1963). Sin embargo, otros estudios realizados en derrames malignos han mostrado resultados controvertidos. De modo, que Fröhlich y Keller (1967) describieron que los derrames malignos contienen una actividad enzimática máxima de LDH2, LDH3 y LDH4, mientras que derrames benignos aumentan los niveles de LDH4 y LDH5. En cambio, Paavonen y col, no hallaron diferencias en la composición de isoenzimas cuando comparan derrames malignos y benignos (Paavonen *et al*; 1991).

Relación de las isoenzimas de LDH con los hematíes y las células nucleadas del líquido pleural

Hemos encontrado que la actividad enzimática total de la LDH es mayor en los derrames con mayor contenido hemático. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Porcel y col (2008), en su trabajo, los autores encuentran una relación de LDH con el número de hematíes. Además, nuestros resultados demuestran que los valores de LDH1, isoenzima predominante en el hematíe, y de subunidades H, se encuentran aumentados en los líquidos pleurales que contienen un mayor número de hematíes. Sin embargo, Light (1973) encontró un ligero aumento de LDH1 en cinco de los doce líquidos con más de 100.000 hematíes/mm³, de modo que señalan que la presencia de sangre en el líquido pleural no influiría en las concentraciones de LDH. Por el contrario, hemos encontrado una relación significativa entre los líquidos que contenían más de 100.000 hematíes/mm³ y la proporción de LDH1 ($r = 0,628$; $p < 0,05$).

Por otro lado, la asociación de las isoenzimas con las células nucleadas del líquido pleural no está bien documentada en la literatura. Se ha sugerido una posible asociación de los leucocitos polimorfonucleares con los valores aumentados de LDH4 y LDH5 de los derrames que cursan con elevado componente de inflamación pleural, como en los casos de derrames de etiología infecciosa o por tromboembolismo pulmonar (Light et al., 1973; Vergnon et al, 1984). Nuestro estudio, establece únicamente una relación de la isoenzima LDH4 y LDH-M con los leucocitos polimorfonucleares de los derrames paraneumónicos complicados. Sin embargo, no hemos podido confirmar otras asociaciones.

Otra área de incertidumbre en el estudio de las enfermedades pleurales se plantea con el diagnóstico de los derrames malignos. La citología del líquido pleural es el método más sencillo para diagnosticar el derrame pleural maligno. Sin

embargo, dependiendo de una serie de factores, su sensibilidad oscila entre el 40-85 %. En nuestra serie, la sensibilidad de la citología en los derrames malignos fue del 46,6 %, similar a la obtenida en una de las mayores series publicadas de derrame pleural (Porcel *et al.*, 2014).

Se ha sugerido que las isoenzimas de LDH pueden aportar información al estudio citológico y sugerir un origen maligno cuando la citología es negativa en los derrames de origen maligno (Lossos *et al.*, 1997). En nuestro estudio, los derrames malignos, que habían sido confirmados mediante citología, presentaron valores más elevados de LDH5 y de subunidades M respecto a los benignos. Sin embargo estas diferencias no alcanzaron la significación estadística. En este sentido Nevin y Mulholland describieron una relación entre las subunidades M del líquido pleural y el resultado positivo de la citología (Nevin *et al.*, 1988). Un hallazgo interesante en nuestro estudio, es la aportación de las isoenzima de LDH a la diferenciación entre exudados benignos y malignos cuando no se dispone de una confirmación citológica para malignidad. Entre estos grupos, hemos encontrado que los exudados benignos contienen valores más altos de LDH5 y LDH-M que los derrames malignos con citología negativa. Se ha sugerido, que en los derrames malignos con citología negativa, el grado de afectación pleural por tejido maligno podría no ser suficiente para incrementar los valores de LDH5 y LDH-M (enzimas anaeróbicamente activas) en líquido pleural, de modo que estas isoenzimas se encontrarían descendidas en los derrames de origen neofornativo debido a las escasas células malignas en el líquido pleural (Vergnon *et al.*, 1984; Nevin *et al.*, 1988).

El papel de los marcadores tumorales para establecer un diagnóstico diferencial entre derrames malignos y benignos es limitado. A pesar de su elevada especificidad (85-96 %), presentan una baja sensibilidad (25-55 %). De modo que no se recomienda el uso de un único marcador tumoral para el diagnóstico del

derrame pleural maligno (Liang *et al.*, 2008; Ferreiro *et al.*, 2015). Además no son específicos de enfermedad maligna (García-Pachón *et al.*, 1997). Y aunque no se recomienda su uso rutinario en el estudio del líquido pleural, se ha sugerido que podrían ser de utilidad para seleccionar a aquellos casos de etiología desconocida, especialmente si se plantean técnicas invasivas que podrían estar indicadas cuando la citología es negativa y los marcadores positivos. En este sentido, sería interesante, encontrar nuevos parámetros que permitiese identificar aquellos casos que precisen exploraciones invasivas, no exentas de riesgo como la pleuroscopia, para establecer el diagnóstico de malignidad. En nuestro trabajo, hemos estudiado la aportación de las isoenzimas de LDH para identificar derrames malignos. Como se ha visto, los derrames pleurales malignos presentan un perfil de isoenzimas que difiere de los derrames benignos. Sin embargo, cuando evaluamos su posible utilidad clínica, no se ha podido determinar un punto de corte adecuado de los parámetros analizados que permitiese establecer el origen maligno del derrame, ya que para un valor de LDH2 superior a 145 U/L la sensibilidad y especificidad fueron de 55 % y 70 % respectivamente.

No obstante, este trabajo puede tener limitaciones. La muestra estudiada corresponde a un Servicio de Neumología y puede no ser representativa para su aplicación en otros ámbitos de atención sanitaria o variar en función del área geográfica. Además, debido a la baja prevalencia de tuberculosis en nuestro medio, no hemos podido incluir pleuritis tuberculosas en el presente trabajo, de modo que no se ha podido establecer la distribución de las isoenzimas de LDH en este grupo de derrames. Otra de las principales limitaciones que encontramos es la difícil accesibilidad en los laboratorios de análisis clínicos para determinar las isoenzimas de LDH. A pesar de que su determinación mediante electroforesis es un método relativamente sencillo que requiere pequeñas muestras, el kit comercial disponible realiza el análisis en series de trece muestras. Por tanto, no resulta una técnica útil para el análisis inmediato de los derrames pleurales y la obtención de resultados en

el momento de la toracocentesis. En caso de que se decidiera su aplicación práctica, debería incluirse su determinación en los analizadores automáticos.

Nuestros resultados demuestran que la composición de isoenzimas en el líquido pleural difiere en función de la etiología del derrame y se han podido definir las características de los perfiles de isoenzimas de LDH en las diferentes causas del derrame. Las isoenzimas de LDH permiten diferenciar trasudados de exudados con una eficiencia similar a los criterios convencionales pero mejorando el rendimiento en los trasudados mal clasificados por estos criterios, lo que resulta de especial interés. También puede diferenciar los derrames benignos de los malignos con resultados similares a los descritos para diversos marcadores tumorales. En resumen, este estudio ha permitido realizar un análisis muy amplio y detallado de las isoenzimas de la LDH en líquido pleural, de acuerdo a los más exigentes requisitos metodológicos, que establece su composición en función de grupos diagnósticos y sus potenciales aportaciones diagnósticas.



CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

- Los derrames pleurales tienen composiciones diferentes en sus proporciones y contenidos de isoenzimas de LDH en función de su etiología.
- Los valores de isoenzimas son útiles para diferenciar los trasudados de los exudados pleurales. Los trasudados pleurales tienen más LDH1, LDH2 y LDH-H. Por el contrario, los exudados tienen más LDH2, LDH5 y LDH-M.
- La mayor rentabilidad diagnóstica para diferenciar trasudados y exudados se obtiene con el valor de LDH4, el valor de LDH5, la proporción de la subunidad M de la LDH y el valor de la subunidad M de la LDH.
- La subunidad LDH-M permite identificar el 60 % de los trasudados mal clasificados por los criterios de Light.
- Los derrames pleurales malignos tienen un perfil de isoenzimas de LDH ligeramente distinto a la de los derrames benignos. Los derrames malignos, con respecto a los benignos, tienen menor proporción de la isoenzimas LDH1 y mayor proporción de la subunidad M de la LDH.
- Los exudados de origen maligno contienen una mayor proporción de LDH2 respecto a los de origen benigno, aunque estas diferencias no alcanzaron la significación estadística.
- En los derrames malignos, la composición de isoenzimas de LDH no difiere con la estirpe tumoral.
- Los valores aumentados de LDH5 y LDH-M sugieren un origen benigno en exudados con citología negativa.
- El perfil isoenzimático de los derrames pleurales paraneumónicos contiene valores más elevados de LDH4, LDH5 y LDH-M, y difiere de los exudados de distintas etiologías.

CONCLUSIONES

- En los derrames paraneumónicos complicados, el valor elevado de LDH que presentan se realiza manteniendo una proporción similar de las isoenzimas.
- Los derrames hemáticos contienen proporciones mayores de LDH1.
- Se ha establecido una relación de las isoenzimas LDH4 y LDH-M con las células nucleadas del líquido pleural de los derrames paraneumónicos complicados.
- La aplicación de las isoenzimas de LDH obtiene resultados similares a otros parámetros empleados para diferenciar causas de derrame pleural, aunque la no disponibilidad de su resultado de modo inmediato con las técnicas actuales puede limitar su uso.





BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abrams L. A pleural biopsy punch. *Lancet* 1958; 1:30.

Agostini E. Pleural space mechanics. *Physiol Rev* 1972; 52: 57-129.

Alemán C, Alegre J, Armadans LI, Andreu J, Falcó V, Recio J, et al. The value of chest roentgenography in the diagnosis of pneumothorax after toracocentesis. *Am J Med* 1999; 107: 340-343.

Antony VB, Loddenkemper R, Astoul P, Boutin C, Goldstraw P, Hott J, et al. Management of malignant pleural effusions. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1987-2001.

Aquino SL, Webb WR, Gushiken BJ. Pleural exudates and transudates: diagnosis with contrast-enhanced CT. *Radiology* 1994; 92: 803-808.

Arenas-Jiménez J, Alonso-Charterina S, Sánchez-Payá J, Fernández-Latorre F, Gil-Sánchez S, Lloret-Llorens M. Evaluation of CT findings for diagnosis of pleural effusions. *Eur Radiol* 2000; 10: 681-90.

Baba K, Hoosen AA, Langelan N, Dyrhol-Riise AM. Adenosine deaminase activity is a sensitive marker for the diagnosis of tuberculous pleuritic in patients with very low CD4 counts. *PLoS One* 2008; 3: e2788.

Barbé F, Querol M, Nolla M, Monasterio C. Adenosindesaminasa y mesotelioma. *Med Clin (Barc)* 1990; 95: 276-277.

Bharnagar R, Maskell NA. Treatment of complicated pleural effusions in 2013. *Clin Chest Med* 2013; 34: 47-62.

Bartter T, Mayo PD, Pratter MR, Santarelli RJ, Leeds, Akers SM. Lower risk and higher yield for thoracocentesis when performed by experienced operators. *Chest* 1993; 103: 1873-6.

Bartter T, Santarelli, Akers SM, Pratter MR. The evaluation of pleural effusion. *Chest* 1994; 106: 1209-1214.

Baysal T, Bulut T, Gakirmak M, Kalkan S, Dusak A, Dogan M. Diffusion-weighted MR imaging of pleural fluid: differentiation of transudative vs exudative pleural effusions. *Eur Radiol* 2004; 14: 890-896.

Ben SQ, Ni SS, Shen HH, Shi YX, Huang SB, Xu JH, et al. The dynamic changes of LDH isoenzyme 3 and D-dimer following pulmonary thromboembolism in canine. *Throm Res* 2007; 120: 575-583.

Benamore RE, Scott K, Richards CJ, Entwisle JJ. Image-guided pleural biopsy: diagnostic yield and complications. *Clin Radiol* 2006; 61: 700-705.

Broaddus VC. Diuresis and transudatives effusions. Changing the rules of the game. *Am J Med* 2001; 110: 732-735.

Bielsa S, Salud A, Martínez M, Esquerda A, Martín A, Rodríguez Panadero M, et al. Prognostic significance of pleural fluid data in patients with malignant effusion. *Eur J Intern Med* 2008; 19: 334-339.

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.

Burgess LJ, Maritz FJ, Taljaard JF. Comparative analysis of the biochemical parameters used to distinguish between pleural transudates and exudates. *Chest* 1995; 107: 1604-1609.

Cabrer B, Bofill D, Grau A, Jorge S, Vivancos J, Ballcells A. Valor de la colinesterasa en líquido pleural para su diagnóstico etiológico. *Rev Clin Esp* 1978; 150: 183-184.

Canalias F. Isoenzimas y formas múltiples de las enzimas en bioquímica clínica. Barcelona: Edit. Sociedad española de bioquímica clínica y patología molecular. 1996; 61-67.

Castelain G. La biopsie pleural: presentation d'une arguille nouvelle. *Jour Fr Med* 1964; 18: 355.

Chalmers JD, Singanayagam A, Murray MP, Scally C, Fawazi A, Hill AT. Risk factors for complicated paraneumonic effusion and empyema on presentation to hospital with community-acquired pneumonia. *Thorax* 2009; 64: 592-7.

Chambers A, Routledge T, Dunning J, Sacri M. Is video-assisted thoracoscopic surgical decortication superior to open surgery in the management of adults with primary empyema? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2010; 11: 171-177.

Cheng DS, Rodriguez RM, Rogers J, Wagster M, Starnes DL, Light RW. Comparison of pleural fluid pH values obtained using blood gas machine, pH meter, and pH indicator strip. *Chest* 1998; 114: 1368-1372.

Chierakul N, Kanitsap A, Chaiprasert A, Viriyataveekul R. A simple C-reactive protein measurement for the differentiation between tuberculous and malignant pleural effusion. *Respirology* 2004; 9: 66-69.

Chira R, Chira A, Mirce PA. Thoracic Wall ultrasonography-normal and pathological findings. *Med Ultrason* 2001; 13: 228-33.

Chung JH, Kim YS, Kim SI, Park K, Park MS, Kim YS, et al. The diagnostic value of the adenosine deaminase activity in the pleural fluid of renal transplant patients with tuberculous pleural effusion. *Yonsei Med J* 2004; 45: 661-664.

Clive AO, Kahan BC, Hooper CE, Bhatnagar R, Morley AJ, Zahan-Evans N, et al. Predicting survival in malignant pleural effusions: development and validation of the LENT prognostic score. *Thorax* 2014; 69: 1098-1104.

Cobben NA, Van Belle AF, Pennings HJ, Mulder PG, Van Dieijen-Visser MP, Wouters EF, et al. Diagnostic value of lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in pleural effusions. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 523-528.

Colice GL, Curtis A, Deslauriers J, Heffner J, Light R, Littenberg B, et al. Medical and surgical treatment of parapneumonic effusions: an evidence-based guide-line. *Chest* 2000; 118: 1158-1171.

Collins JD, Burwell D, Furmanski S, Lorber PS. Minimal detectable pleural effusions. *Radiology* 1972; 105: 51-53

Collins TR, Sahn SA. Thoracocentesis: clinical value, complications, technical problems and patients experience. *Chest* 1987; 91: 817-822.

Cope C. New pleural biopsy needle; preliminary study. *JAMA* 1958; 167: 1107.

Costa M, Quiroga T, Cruz E. Measurement of pleural fluid cholesterol and lactate dehydrogenase: a simple and accurate set of indicators for separating exudates from transudates. *Chest* 1995; 108: 1260-1263.

Davies HE, Davies RJO, Davies CWH on behalf of the BTS Pleural Disease Guideline Group. Management of pleural infection in adult. British Thoracic Society pleural disease guideline 2010. *Thorax*; 65 Suppl 2. li41e53.

DeSouza R, Lipsett N, Spagnolo SV: Mediastinal compression due to tension hydrothorax. *Chest* 1944; 72: 782.

Dekker A, Bupp PA. Cytology of serous effusions. An investigation into the usefulness of cell blocks versus smears. *Am J Clin Pathol* 1978; 70: 855-860.

Drent M, Cobben NAM, Henderson R.F, Wouters EFM, van Dieijen-Visser MP. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. *Eur Respir J* 1996; 9: 1736-1742.

Drent M, Cobben NAM, Henderson R.F, Jacobs JA, Wouters EFM, van Dieijen-Visser MP. BAL fluid LDH activity and LDH isoenzymes pattern in lipoid pneumonia caused by an intravenous injection of lamp oil. *Eur Respir J* 1996; 9: 2416-2418.

Duysinx B, Nguyen D, Louis R, Cataldo D, Belhocine T, Bartsch P, Bury T. Evaluation of pleural disease with 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging. *Chest* 2004; 125: 489-493.

Duysinx BC, Larock MP, Nguyen D, Corhay JL, Bury T, Hustinx R, et al. 18F-FDG PET imaging in assessing exudative pleural effusions. *Nucl Med Commun* 2006; 27: 971-976.

Eid AA, Keddisi JI, Samaha M, Tawk MM, Kimell K, Kinasewitz GT. Exudative effusions in congestive heart failure. *Chest* 2002; 122: 1518-1523.

Falcones MV, Herrero R, Pérez-Rodríguez E. Derrame pleural maligno y cáncer de mama. ¿Características diferentes?). *Arch Bronconeumol* 2005; 41 (suppl): 144.

Fernández C, Martín C, Aranda I, Romero S. Malignant transient pleural transudate. A sign of early tumoral obstruction. *Respiration* 2000; 67: 333-336.

Ferreiro L, San José E, Valdés L. Tuberculous pleural fluid. *Arch bronconeumol* 2014; 50: 435-443.

Ferreiro L, San José E, Valdés L. Management of parapneumonic pleural effusion in adults. *Arch bronconeumol* 2015; 51: 637-646.

Fraser RS, Müller NL, Colman N, Paré PD. Diagnóstico de las enfermedades del tórax. 4ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana 2002.

Fröhlich C, Keller A. Lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in pleural effusions of benign and malignant etiology and its diagnostic significance. *Klin Wschr* 1967; 45: 457-461.

Goodfray CM, Ross ML, Henderson AR. Ten electrophoretic methods compared with a selected for quantifying lactate dehydrogenase isoenzymes in serum. *Clin Chem* 1988; 34: 1985-1890.

Galborini RL. Adenosine deaminase in the diagnosis of tuberculous pleural effusion: is it really an ideal test: A word of caution. *Chest* 2005; 127; 127: 417-418.

Gakis C, Calia C, Naitana A, Primo D, Serru G. Serum adenosine deaminase activity in HIV positive subjects: A hypothesis on the significance of ADA-2. *Panminerva Med* 1989; 31: 107-13.

García-Pachón E, Padilla-Navas I, Sánchez JF, Jiménez B, Custardoy J. Pleural fluid to serum cholinesterase ratio for the separation of transudates and exudates. *Chest* 1996; 110: 97-101.

García-Pachón E, Padilla-Navas I, Dosada D, Miralles-Llopis A. Elevated level of carcinoembryonic antigen in nonmalignant pleural effusions. *Chest* 1997; 111: 643-647.

García-Pachón E, Padilla-Navas I. The diagnostic usefulness of cholinesterase in pleural exudates. *Rev Clin Esp* 1997; 197: 402-5.

García-Pachón E, Llorca I. Diagnostic value of C-reactive protein in exudative pleural effusions. *Eur J Intern Med* 2002; 13: 246-249.

García-Pachón E, Padilla-Navas I. Urinothorax: Case report and review of the literature with emphasis on biochemical diagnosis. *Respiration* 2004; 71: 7-15.

García-Pachón E, Soler MJ, Padilla-Navas I, Romero V, Shum C. C-reactive protein in lymphocytic pleural effusions: a diagnostic aid in tuberculous pleuritis. *Respiration* 2005; 72: 486-489.

Giannoulaki E, Clagett G, Wolf R, Cafferty P, Harmon J, Rich N. Lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in sera of patients with malignant diseases. *Clin Chem* 1989; 35: 396-399.

Good JT, Taryle DA, Sahn SA. The pathogenesis of low glucose, low pH malignant effusions. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 737-741.

Goodman RB, Wood RG, Martin TR, Hansos-Painton O, Kinasewitz GT. Cytokine-stimulated human mesothelial cells produce chemotactic activity for neutrophils including NAP-1/IL-8. *J Immunol* 1992; 148: 457-65.

Gryminiski J, Krakówka P, Lypacewicz G. The diagnosis of pleural effusion and radiologic techniques. *Chest* 1976; 70: 33-37.

Hagadorn JE, Bloor CM, Yang MS. Elevated plasma activity of lactate dehydrogenase isoenzyme-3 (LDH3) in experimentally-induced immunologic lung injury. *Am J Pathol* 1971; 64: 575-584.

Hamm H, Brohan U, Bohmer R, Missmahl HP: Cholesterol in pleural effusions: a diagnostic aid. *Chest* 1987; 92: 296-302.

Hamm H, Light RW. Parapneumonic effusion and empyema. *Eur Respir J* 1997; 10: 1150-6.

Haro-Estarriol M, Álvarez-Castillo LA, Baldo-Pedro X, Ramírez-Malagón JM, Rubio-Goday M, Sendra-Salillas S. Influence of thoracocentesis and pleural biopsy on biochemical parameters and cytology of pleural fluid. *Arch Bronconeumol* 2007; 43: 277-282.

Harris RJ, Kavuru MS, Mehta AC, Medendorp SV, Wiederman HP, Kirby TJ, et al. The impact of thoracoscopy on the management of pleural disease. *Chest* 1995; 107: 845-852.

Hayderman RS, Makunike R, Muza T, Odwee M, Kadzirange G, Manyemba J, et al. Pleural tuberculosis in Harare, Zimbabwe: the relationship between human immunodeficiency virus, CD4 lymphocyte count, granuloma formation and disseminated disease. *Trop Med Int Health* 1998; 3: 14-20.

Heffner JE, Brown LK, Barbieri C, DeLeo JM. Pleural fluid chemical analysis in parapneumonic effusions: A meta-analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1700-1708.

Heffner JE, Brown LK, Barbieri C. Diagnostic value of test that discriminate between exudative and transudative pleural effusions *Chest* 1997; 111: 970-980.

Heffner JE. Indications for draining a parapneumonic effusion: an evidence-based approach. *Semin Respir Infect* 1999; 14: 48-58.

Heffner JE, Klein JS, Hampson C. Interventional management of pleural infections. *Chest* 2009; 136: 1148-1159.

Heffner JE, Klein JS, Hampson C. Diagnostic utility and clinical application of imaging for pleural space infections. *Chest* 2010; 137: 467-479.

Hillerdal G. Chylothorax and pseudochylothorax. *Eur Respir J*. 1997; 10: 1157-62.

Hooper C, Lee G, Maskell N, BTS Pleural Guideline Group. Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society pleural disease guideline 2010. *Thorax* 2010; 65 (Suppl 2): 4-17.

Idell S, Zwieb C, Kumar A, Koenig KB, Johnson AR. Pathways of fibrin turnover of human pleural mesothelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7: 414.

Jiménez-Castro D, Díaz G, Pérez-Rodríguez E, Prieto E, Yusen RD. Modification of pleural fluid pH by local anesthesia. *Chest* 1999; 116: 399-402.

Jiménez-Castro D, Pérez-Rodríguez E, Díaz G, Foque L, Light RW. Determining the optimal number of specimens to obtain with needle biopsy of the pleura. *Respir Med* 2002; 96: 14-7.

Jiménez Castro D, Díaz Nuevo G, Pérez-Rodríguez E. Comparative analysis of Light's criteria and other biochemical parameters to distinguish exudates from transudates. *Rev Clin Esp* 2002; 202: 3-6.

Jiménez Castro D, Díaz Nuevo G, Pérez-Rodríguez E, Light RW. Diagnostic value of adenosine deaminase in nontuberculous lymphocytic pleural effusions. *Eur Respir J* 2003; 21: 220-224.

Jiménez D, Díaz G, García-Rull S, Vidal R, Sueiro A, Light RW. Routine use of pleural fluid cultures. Are they indicated? Limited yield, minimal impact on treatment decisions. *Respir Med* 2006; 100: 2048-2052.

Jones PW, Moyers JP, Rogers JT, Rodríguez RM, Lee YC, Light RW. Ultrasound-guided thoracocentesis: is it a safer method?. *Chest* 2003; 123: 418-23.

Kearney SE, Davies CWH, Davies RJO. Computed tomography and ultrasound in parapneumonic effusions and empyema. *Clin Radiol* 2000; 55: 542-547.

Kotyza J, Havel D, Klda V, Bunatova K, Pesek M. Differentiated expression of the lactate dehydrogenase subunit M in pleural fluids of neoplastic etiology. *Scand J Clin Lab Invest* 2009; 69: 73-78.

Kuz'minskaya UA, Alekhina SM. Effect of chlorocamphene on the isoenzyme spectrum of lactate dehydrogenase in rat serum and liver. *EHP* 1976; 13: 127-1976.

Lama A, Ferreiro L, Toubes ME, Golpe A, Gude F, Álvarez-Dobaño et al. Characteristics of patients with pseudochylothorax - a systematic review. *J Thorac Dis* 2016; 8: 2093-2101.

Lee YC, Rogers JT; Rodríguez RM, Miller KD, Light RW. Adenosine deaminase levels in nontuberculous lymphocytic pleural effusions. *Chest* 2001; 120: 356-361.

Lee P, Colt HG. Pleuroscopy in 2013. *Clin Chest Med* 2013; 34: 81-91.

Leuallen EC, Carr DT. Pleural effusion, a statistical study of 436 patients. *N Engl J Med* 1955; 252: 79-83.

Liao H, Na MJ, Dikensoy O, Lane KB, Randal B, Light RW. Diagnostic value of pleural fluid pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) levels in patients with cardiovascular diseases. *Respirology* 2008; 13: 53-57.

Liang QL, Shi HZ, Wang K, Qin SM, Qin XJ. Diagnostic accuracy of adenosine deaminase in tuberculous pleurisy. A metaanalysis. *Respir Med* 2008; 46: 909-912.

Liang QL, Shi HZ, Qin XJ, Liang XD, Jiang J, Yang HB. Diagnostic accuracy of tumour markers for malignant pleural effusion: a metaanalysis. *Thorax* 2008; 63: 35-41.

Light RW, Mc Gregor MI, Luchsinger PC, Ball WC. Pleural effusions: The diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med* 1972; 77: 507-513.

Light RW, Ball WC. Lactate dehydrogenase isoenzymes in pleural effusion. *Am Rev Respir Dis* 1973; 108: 600-604.

Light RW, Erozan YS, Ball WC Jr. Cells in pleural fluid: their value in differential diagnosis. *Arch Intern Med* 1973; 132: 854-860.

Light RW, MacGregor MI, Ball WC, Luchsinger PC. Diagnostic significance of pleural fluid pH and pCO₂. *Chest* 1973; 64: 591-596.

Light RW, Girard WM, Jenkinson SG, George RB. Parapneumonic effusions. *Am J Med* 1980; 69: 985-986.

Light RW. Diagnostic principles in pleural disease. *Eur Respir J* 1997; 10: 476-481.

Light RW. Pleural effusions. *N Engl J Med* 2002; 346: 1971-1977.

Light RW. Update on tuberculous pleural effusion. *Respirology* 2010; 15: 451-458.

Light RW. Pleural diseases. 6th edition. Philadelphia. Lippincott. Williams & Wilkins, 2013

Lossos IS, Breuer R, Intrator O, Sonenblick M. Differential diagnosis of pleural effusion by lactate dehydrogenase isoenzyme analysis. *Chest* 1997; 111: 648-651.

Lossos IS, Intrator O, Berkman N, Breuer R. Lactate dehydrogenase isoenzyme analysis for the diagnosis of pleural effusion in haemato-oncological patients. *Respiratory Medicine* 1999; 93: 338-341.

Martínez-Moragón E, Aparicio J, Sanchís J, Menéndez R, Rogado M, Sanchís F. Malignant pleural effusion: prognostic factors for survival and response to chemical pleurodesis in a series of 120 cases. *Respiration* 1998; 65: 108-113.

Maskell NA, Gleeson FV, Davies RJ. Standard pleural biopsy versus CT-guided cutting-needle biopsy for diagnosis of malignant disease in pleural effusions: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 361: 1326-1330.

Maskell NA, Davies CW, Nunn AJ, Hedkey, EL, Gleeson FV, Miller R, et al. UK controlled trial of intrapleural streptokinase for pleural infection. *N Engl J Med* 2005; 352: 865-874.

Manjunath N, Shankar P, Rajan L, Bhagava A, Saluja S, Shirinlwas. Evaluation of polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis. *Tubercle* 1991; 72: 21-27.

McKenzie D, Henderson AR. Electrophoresis of lactate dehydrogenase isoenzymes. *Selected Methods. Clin Chem* 1983; 10: 59-67.

McLeod DT, Ternouth I, Nkanza N. Comparison of the Tru-cut biopsy needle with the Abrams punch for pleural biopsy. *Thorax* 1989; 44: 794-796.

McLoud TC, Flower CDR. Imaging the pleura. Sonography, CT and MR imaging. *AJR Am J Roentgenol* 1991; 156: 1145-1153.

Meisel S, Shamiss A, Thaler M, Nussinovitch N, Rosenthal T. Pleural fluid to serum bilirubin concentration ratio for the separation of transudates from exudates. *Chest* 1990; 98: 546-549.

Moskowitz H, Platt RT, Schachar R, Mellins H. Roentgen visualization of minute pleural effusion. *Radiology* 1973; 109: 33-35.

Nevin GB, Mulholland P. Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in serous effusions. *Ir J Med Sci* 1988; 157: 256-257

Nishikawa A, Tanaka T, Takeuchi T, Fujihira S, Mori H. The diagnostic significance of lactate dehydrogenase isoenzymes in urinary cytology. *Br J Cancer* 1991; 63: 819-821.

Noppen M. Normal volume and cellular contents of pleural fluid. *Curr Opin Pulm Med* 2001; 7: 180-182.

Ocaña I, Ribera E, Martínez-Vázquez JM, Ruiz I, Bejarano E, Pigrau C, et al. Adenosine deaminase activity in rheumatoid pleural effusion. *Ann Rheum Dis* 1988; 47: 394-397.

Pai M, Flores LL, Hubbard A, Riley LW, Colford Jr JM. Nucleic acid amplification test in the diagnosis of tuberculous pleuritic: A systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2004; 4: 6.

Panteghini M, Babies R. Serum enzymes. In: Burtis C, Brunis D, eds. *Teitz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 7th ed. St Louis, MO: Elsevier Saunders; 2014: 318-336.

Paavonen T, Liippo K, Aronen H, Kiistala U. Lactate dehydrogenase, creatine kinase, and their isoenzymes in pleural effusions. *Clin Chem* 1991; 37: 1909-1912.

Pérez-Rodríguez E, Castro DJ. The use of ADA and ADA isoenzymes in the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Curr Opinion* 2000; 6: 259-266.

Pessoa FM, de Melo AS, Souza AS Jr, de Souza LS, Hochhegger B, Zanetti G, et al. Applications of magnetic resonance imaging of the thorax in pleural disease: A state-of-the-art review. *Lung* 2016; 194: 501-509.

Pine JR, Hollman JL. Elevated pleural fluid pH in *Proteus mirabilis* empyema. *Chest* 1983; 84: 109-111.

Porcel JM, Vives M, Vicente de Vera MC, Cao G, Rubio M, Rivas MC. Useful test on pleural fluid that distinguish transudates from exudates. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 671-675.

Porcel JM, Vives M. Adenosine deaminase levels in nontuberculous lymphocytic pleural effusions. *Chest* 2002; 121: 1379-1380.

Porcel JM, Vives M. Etiology and pleural fluid characteristics of large and massive effusions. *Chest* 2003; 124: 978-983.

Porcel JM, Vives M, Esquerda A, Salud A, Pérez B, Rodríguez-Panadero F. Use of a panel of tumor markers (carcinoembryonic antigen, cancerantigen 125, carbohydrate antigen 15.3, and cytokeratin 19 fragments) in pleural fluid for the

differential diagnosis of benign and malignant effusions. *Chest* 2004; 126: 1757-1763.

Porcel JM, Esquerda A, Martínez M, Rodríguez-Panadero F, Blesa S. Influence of pleural fluid red blood cell count on the misidentification of transudates. *Med Clin* 2008; 131: 770-772.

Porcel JM. Utilization of B-type natriuretic peptide and NT-pro BNP in the diagnosis of pleural effusion due to heart failure. *Curr Opin Pulm Med* 2011; 17: 215-219.

Porcel JM. Pearls and myths in pleural fluid analysis. *Respirology* 2011; 16: 44-52.

Porcel JM, Esquerda A, Vives M, Bielsa S. Etiology of pleural effusions: Analysis of more than 3000 consecutive thoracenteses. *Arch Bronconeumol* 2014; 50: 161-165.

Porcel JM, Hernández P, Martínez-Alonso M, Bielsa S, Salud A. Accuracy of Fluorodeoxyglucose-PET Imaging for differentiating benign from malignant pleural effusions. *Chest* 2015; 147: 502-512.

Porcel JM, Esquerda A, Martínez-Alonso M, Bielsa S, Salud A. Identifying thoracic malignancies through pleural fluid biomarkers. A predictive multivariate model. *Medicine* 2016; 95: 1-8.

Porcel JM, Valencia H, Bielsa S. Factors influencing pleural drainage in parapneumonic effusions. *Rev Clin Esp* 2016; 216: 361-366.

Prakash UBS, Reiman HM. Comparison of needle biopsy with cytologic analysis for the evaluation of pleural effusion: analysis of 414 cases. *Mayo Clin Proc* 1985; 60: 158-164.

Qureshi NR, Gleeson FV. Imaging of pleural disease. *Clin Chest Med* 2006; 27: 193-213.

Qureshi NR, Rahman NM, Gleeson FV. Thoracic ultrasound in the diagnosis of malignant pleural effusions. *Thorax* 2009; 64: 139-143.

Rahman NM, Mishra EK, Davies HE, Davies RJ, Lee G. Clinically important factors influencing the diagnostic measurement of pleural fluid pH and glucose. *Am J Respir Care Med* 2008; 178: 483-490.

Race GA, Scheifly CH, Edwards JE. Hydrothorax in congestive heart failure. *Am J Med* 1957; 22: 83-89.

Richterich R, Burger A. Lactate dehydrogenase isoenzymes in human cancer cells and malignant effusions. *Enzymol Biol Clin* 1963; 3: 65-72.

Rodríguez Panadero F, López Mejias J. Low glucose and pH levels in malignant pleural effusions. Diagnostic significance and prognostic value in respect to pleurodesis. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 663-667.

Romero S, Candela A, Martín C, Hernández L, Trigo C, Gil J. Evaluation of different criteria for the separation of pleural transudates from exudates. *Chest* 1993; 104: 339-404.

Romero S, Fernández C, Arriero JM, Espasa A, Candela A, Martín C, et al. CEA, CA15-3 and CYFRA 21-1 in serum and pleural fluid of patients with pleural effusions. *Eur Respir J* 1996; 9: 17-23.

Romero-Candeira S, Fernández C, Martín C, Sánchez-Payá J, Hernández L. Influence of diuretics on the concentration of proteins and other components of pleural transudates in patients with heart failure. *Am J Med* 2001; 110: 681-686.

Romero S, Martínez A, Hernández L, Fernández C, Espasa A, Candela A, et al. Light's criteria revisited: consistency and comparison with new proposed alternative criteria for separating pleural transudates from exudates. *Respiration* 2000; 67: 18-23.

Romero Candeira S, Hernández Blasco L, Soler MJ, Muñoz A, Aranda I. Biochemical and cytology characteristics of pleural effusions secondary to pulmonary embolism. *Chest* 2002; 121: 465-469.

Romero-Candeira S, Hernández L, Romero-Brufao S, Orts D, Fernández C, Martín C. Is it meaningful to use biochemical parameters to discriminate between transudative and exudative pleural effusions? *Chest* 2002; 122: 1524-1529.

Roth BJ, O'Meara TF, Cragun WH. The serum-effusion albumin gradient in the evaluation of pleural effusions. *Chest* 1990; 98: 546-549.

Rolf LL, Travis DM. Pleural fluid plasma bicarbonate gradients in oxygen-toxic and normal rats. *Am J Physiol* 1973; 224: 857-861.

Rotenberg Z, Weinberger I, Davison E, Fuchs J, Harell D, Agmon J. Alterations in total lactate dehydrogenase and its isoenzyme-5 in hepatic disorders. *Ann Clin Lab Sci.* 199; 20: 268-273.

Ruan SY, Chuang YC, Wang JY, Lin JW, Chien JY, Huang CT, et al. Revisiting tuberculous pleurisy: Pleural fluid characteristics and diagnostic yield of mycobacterial culture in an endemic area. *Thorax* 2012; 67: 822-827.

Saraya T, Light RW, Takizawa H, Goto H. Black pleural effusion. *Am J Med* 2013; 126: 641. e1-6.

Sahn SA, Wilcox MI, Good JT, Potts DE, Filley G.F. Characteristics of normal rabbit pleural fluid: physiologic and biochemical implications. *Lung* 1979; 156: 63-69.

Sahn SA, Taryle DA, Good TJ Jr. Experimental empyema: time course and pathogenesis of pleural fluid acidosis and low pleural glucose. *Am Rev Respir Dis* 1979; 120: 355-361.

Sahn SA, Kaplan RL, Marlitz RM, Good JT Jr. Rheumatoid pleurisy: observations on the development of low pleural fluid pH and glucose level. *Arch Intern Med* 1980; 140: 1237-1238.

Sahn SA, Reller LB, Taryle DA, Antony VB, Good JT. The contribution of leukocytes and bacteria to the low pH of empyema fluid. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 811-815.

Sahn SA. The pleura. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 184-234.

Sahn SA. Malignant pleural effusions. *Clinics Chest Med* 1998; 19: 351-361.

Sahn SA, Good JT. Pleural fluid pH in malignant effusions. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications. *Ann Intern Med* 1988; 107: 345-9.

Sahn SA. The value of pleural fluid analysis. *Am J Med Sci* 2008; 335: 7-15.

Sahn SA. Getting the most from pleural fluid analysis. *Respirology* 2012; 17: 240-277.

Saint-Remy P, Buret J, Radermecker M. Significance of lactate dehydrogenase in pleural effusions. *Rev Pneumol* 1986, 42: 74-81.

Sánchez-Armengol A, Rodríguez-Panadero F. Survival and talc pleurodesis in metastatic pleural carcinoma, revisited. *Chest* 1993; 104: 1482-1485.

Sánchez Hernández I, Ussetti Gil P, Delgado Cicerol V, Gallardo Carrasco J, Arias Carrillo F, Hontoria Suárez J. Cholesterol in pleural fluid. Usefulness in differentiating exudates and transudates. *Arch Bronconeumol* 1994; 30: 240-244.

Schumman G, Bonora R, Ceriotti F, Féraud G, Ferrer CA, Franck PF, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C, part 3: reference procedure for the measurement of catalytic concentration of lactate dehydrogenase. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 643-648.

Seneff MG, Corwin RW, Gold LH, Irwin RS. Complications associated with thoracentesis. *Chest* 1986; 90: 97-100.

Sevinc A, Sari R, Fadillioglu E. The utility of lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in the diagnostic evaluation of malignant and non malignant ascites. *J Natl Med Assoc* 2005; 97: 79-84.

Shen Y, Zhu H, Wan C, Chen L, Wang T, Yang T, Wen F. Can cholesterol be used to distinguish pleural exudates from transudates? Evidence from a bivariate meta-analysis. *BMC Pulm Med* 2014, 14: 61.

Smith RL, Ripps CS, Lewis ML. Elevated lactated dehydrogenase values in patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Chest* 1988; 93: 987-992.

Shivakumarswamy U, Araken SU, Kangowdar MH, Yelikar BR. Diagnostic utility of the cell block method versus the conventional smear study in pleural fluid cytology. *J Cytol* 2012; 29: 11-15.

Smyrniotis NA, Jederlinic PJ, Irwin RS. Pleural effusion in an asymptomatic patient. Spectrum and frequency of causes and management considerations. *Chest* 1990; 97: 1992-1996.

Soler-Sempere MJ, Vicente-Ibarra N, Heredia-Oliva L. An unusual case of left-sided massive hemothorax. *Int J Respir Pulm Med*. 2015; 2: 4.

Svigals PZ, Chopra A, Ravenel JG, Nietert PJ, Hugging JT. The accuracy of pleural ultrasonography in diagnosing complicated parapneumonic pleural effusions. *Thorax* 2017; 1: 94-95.

Trail ZC, Davies RJO, Gleeson FV. Thoracic computed tomography in patients with suspected malignant pleural effusions. *Clin Radiol* 2001; 56: 193-6.

Tovar M, Siedner MJ, Gilman RH, Santillan C, Caviedes L, Valencia T, et al. Improved diagnosis of pleural tuberculosis using the microscopic-observation drug-susceptibility technique. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 909-12.

Ugurman F, Gozu A, Gocmen S, Samukasoglu B, Onde G, Akklyoncu B, et al. Effect of iatrogenic haemorrhage on biochemical parameters in pleural effusions. *Respir Med* 2003; 97: 1265-1268.

Valdés L, Pose A, Suárez J, González-Juanatey JR, Sarnadeses A, San José E, Alvarez Dobana JM, et al. Cholesterol: a useful parameter for distinguishing between pleural exudates and transudates. *Chest* 1991; 99: 1097-1102.

Valdés L, San José E, Alvarez D, Sarandeses A, Pose A, Chomón B, et al. Diagnosis of tuberculous pleurisy using the biologic parameters adenosine deaminase, lysozyme and interferon gamma. *Chest* 1993; 103: 458-465.

Valdés L, Álvarez D, San José E, Penela P, González-Juanatey JR, Pose A, et al. Value of adenosine deaminase in the diagnosis of tuberculous pleural effusions in Young patients in a region of high prevalence of tuberculosis. *Thorax* 1995; 50: 600-603.

Valdés L, San José E, Álvarez D, Valle JM. Adenosine deaminase (ADA) isoenzyme analysis in pleural effusions: diagnosis role, and relevance to the origin of increased ADA in tuberculous pleurisy. *Eur Respir J* 1996; 9: 747-751.

Valdés L, Álvarez D, San José E, Penela P, Valle JM, García-Pazos JM, Suárez J, Pose A. Tuberculous pleurisy: a study of 254 patients. *Arch Intern Med* 1998; 158: 2017-2021.

Valsecchi A, Arondi S, Marchetti G. Medical thoracoscopy: Analysis on diagnostic yield through 30 years of experience. *Ann Thorac Med* 2016; 11: 177-1982.

Verma A, Phua CK, Sim WY, Algosio RE, Tee KS, Lew S, et al. Pleural LDH as a prognostic marker in adenocarcinoma lung with malignant pleural effusion. *Medicine*; 95: e3996.

Vergnon JM, Guidollet J, Gateau O, Ripoll JP, Collet P, Louisot P, et al. Lactic dehydrogenase isoenzyme electrophoretic patterns in the diagnosis of pleural effusion. *Cancer* 1984; 54: 507-511.

Vidal R, De Gracia J, Ruiz J, Fite E, Monso E, Martín N. Estudio controlado de 637 pacientes con tuberculosis: diagnóstico y resultados terapéuticos con esquemas terapéuticos de 9 y 6 meses. *Med Clin* 1986; 87: 368-370.

Villena V, Pérez V, Pozo F, López-Encuentra A, Echave-Sustaeta, Arenas J, et al. Amylase levels in pleural effusions: a consecutive unselected series of 841 patients. *Chest* 2002; 121: 470-474.

Villena V, López Encuentra A, Echave Sustaeta J, Álvarez Martínez C, Martín Escribano P. Prospective study of 1.000 consecutive patients with pleural effusion. Etiology of the effusion and characteristics of the patients. *Arch Bronconeumol* 2002; 38: 21-26.

Villena V, López-Encuentra A, Pozo L, Echave-Sustaeta J, Ortuño de Solo B, Estenoz-Alfaro J, et al. Interferon gamma levels in pleural fluid for diagnosis of pleural tuberculosis. *Am J Med* 2003; 115: 365-370.

Villena V, López Encuentra A, García Luján R, Echave-Sustaeta J, Martínez CJ. Clinical implications of appearance of pleural fluid at thoracocentesis. *Chest* 2004; 125: 156-159.

Villena V, Burgues C. Procedimientos en patología pleural. En *Manual de procedimientos SEPAR de procedimientos*. Publicaciones Permanyer 2005; I: 28.

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: 349-72.

Vonhoff, Livolsi. Diagnostic reliability of needle biopsy of the parietal pleura, a review of 272 biopsies. *Am J Clin Pathol* 1975; 64.

Waite RJ, Cabornneau RJ, Balikian JP, Umali CB, Pezzella AT, Nash G. Parietal pleura changes in empyema: appearances at CT. *Radiology* 1990; 175: 145 -150.

Wang NS. The performed stomas connecting the pleura cavity and the lymphatics in the pleura parietal. *Am Rev Respir Dis* 1975; 111: 12-20.

Wang NS. Anatomy and physiology of the pleural space. *Clin Chest Med* 1985; 6:3.

Wernecke K. Ultrasound study of the pleura. *Eur Radiol* 2000; 10: 1515-23.

West SD, Foord T, Davies R. Needle-track metastases and prophylactic radiotherapy for mesothelioma. *Respir Med* 2006; 100: 1037-1040.

Whitaker D, Papadimitriou JM, Walters MN-I: The mesothelium: Its fibrinolytic properties. *J Pathol* 1982; 136:291

Wroblewski F, Wroblewski R. The clinical significance of lactatic dehydrogenase activity of serous effusions. *Ann Inter Med* 1958; 48: 813-822.

Wroblewski F, Gregory KF. Lactic dehydrogenase isoenzymes and their distribution in normal tissue and plasma and in disease states. *Ann NY Acad Sci*; 1961; 94: 912-932.

Yang PC, Luh KT, Chang DB, Wu HD, Yu CJ, Kuo SH. Value of sonography in determining the nature of pleural effusion: analysis of 320 cases. *AJR Am J Roentgenol* 1992; 159: 29-33.

Zhou Q, Chen YQ, Qin SM, Tao XN, Xin JB, Shi HZ. Diagnostic accuracy of T-cell interferon gamma release assays in tuberculous pleurisy: a meta-analysis. *Respirology* 2011; 16: 473-480.

