



Universitat de Lleida

Perfil proteómico (micromatrices proteínicas) del líquido pleural en pacientes con derrame pleural maligno y tuberculoso

M^a Teresa Taberner Bonastre

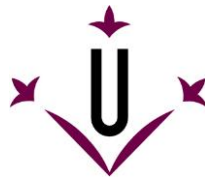
<http://hdl.handle.net/10803/378654>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

**Perfil proteómico (micromatrices
proteínicas) del líquido pleural en
pacientes con derrame pleural
maligno y tuberculoso**



Universitat de Lleida

M^a TERESA TABERNER BONASTRE

TESIS DOCTORAL 2015

Departamento de Medicina, Universidad de Lleida

Programa de doctorado: Investigación clínica en Medicina

DIRECTORES: JOSÉ MANUEL PORCEL PÉREZ

ANTONIETA SALUD SALVIA

Profesores Titulares de Medicina. Universidad de Lleida

Índice



Índice de tablas	2
Índice de figuras	4
Agradecimientos	6
Abreviaciones	7
Resumen	9
Introducción	17
Justificación del estudio	32
Hipótesis	33
Objetivos	34
Material y métodos	35
<ul style="list-style-type: none"> • Población a estudio 	35
<ul style="list-style-type: none"> • Variables 	36
<ul style="list-style-type: none"> • Recogida y análisis de datos 	38
<ul style="list-style-type: none"> • Diseño 	40
<ul style="list-style-type: none"> • Medición de la ADA y marcadores de la validación 	42
<ul style="list-style-type: none"> • Análisis estadístico 	45
Resultados	48
<ul style="list-style-type: none"> • Comparación entre DPM y DP benignos 	51
<ul style="list-style-type: none"> • Comparación entre ADC y MPM 	58
<ul style="list-style-type: none"> • Comparación entre linfoma y TBC 	64
<ul style="list-style-type: none"> • Resultados de la validación 	70
Discusión	76
Conclusiones	89
Bibliografía	90

Índice de tablas

Tabla 1. Estudios de marcadores tumorales clásicos diferenciales entre derrames pleurales malignos y benignos	22
Tabla 2. Resumen de los resultados sobre sensibilidad y especificidad de los marcadores tumorales clásicos determinados en líquido pleural en el metaanálisis de Liang et al (2008)	23
Tabla 3. Diferencias proteicas por inmunohistoquímica entre mesotelioma pleural maligno y adenocarcinoma	24
Tabla 4. Resultados de los estudios incluidos en el metaanálisis de Cui et al (2014) sobre mesotelina en líquido pleural	25
Tabla 5. Variables del modelo 1 del score para diagnosticar tuberculosis en el derrame pleural en el estudio de Porcel & Vives (2003)	27
Tabla 6. Variables modelo 2 del score para diagnosticar TBC pleural en el estudio de Porcel & Vives (2003)	27
Tabla 7. Resumen de los estudios más relevantes publicados sobre proteómica en el derrame pleural	31
Tabla 8. Listado de proteínas evaluadas en la población de derivación	37
Tabla 9. Dosis mínima detectable por ELISA y rango de las proteínas valoradas en la cohorte de validación	44
Tabla 10. Características demográficas de la población	48
Tabla 11. Resultados de las proteínas con diferencias significativas en su expresión entre los DPM y DP benignos en función de las medidas comparativas utilizadas	51
Tabla 12. Listado de proteínas diferenciales entre derrames pleurales malignos y benignos	54
Tabla 13. Intervalo de confianza y valor p de las proteínas significativas en el análisis bivalente entre los derrames pleurales malignos y benignos	55

Tabla 14. Resultados de las proteínas con diferencias significativas en su expresión entre los ADC y MPM en función de las medidas comparativas utilizadas	58
Tabla 15. Intervalo de confianza y valor p de las proteínas significativas en el análisis bivariante entre adenocarcinoma y mesotelioma pleural maligno	61
Tabla 16. Resultados de las proteínas con diferencias significativas en su expresión entre los linfomas y tuberculosos en función de las medidas comparativas utilizadas	64
Tabla 17. Intervalo de confianza y valor p de las proteínas diferenciales entre linfoma y tuberculosis	67
Tabla 18. Análisis comparativo de las proteínas seleccionadas en el grupo de validación entre DPM y DP benigno	70
Tabla 19. Análisis comparativo de las proteínas seleccionadas en el grupo de validación entre ADC y MPM	72
Tabla 20. Distribución de la catepsina B entre tuberculosis y linfomas en el grupo de validación	74
Tabla 21. Estudios sobre el valor de MMP-9 en el derrame pleural	78
Tabla 22. Estudios sobre la PCR en líquido pleural para diferenciar derrame pleural maligno de derrame pleural benigno	80
Tabla 23. Distribución del CA15.3 y CA19.9 en el estudio Wang et al (2014)	82
Tabla 24. AUC e intervalo de confianza del CA15.3 y CA19.9 en el estudio Wang et al (2014)	82
Tabla 25. Comparación de variables bioquímicas en líquido pleural entre linfoma y tuberculosis	85

Índice de figuras

Figura 1. Representación del mecanismo de acción de las micromatrices	29
Figura 2. Representación del mecanismo de acción de los chips de biomarcadores séricos	38
Figura 3. Método de preparación de las muestras de los biochips para su procesamiento	39
Figura 4. Resumen del procedimiento para el procesamiento de las proteínas en la cohorte de validación	43
Figura 5. Heatmap de intensidad relativa de expresión proteica para las muestras de DP de pacientes diagnosticados de DPM (MPM y ADC) vs. TBC. Análisis de proximidad de expresión relativa entre muestras y proteínas	52
Figura 6. Heatmap resultante de la correlación lineal de la expresión proteica entre DPM vs. TBC ($\text{Log}_2(\text{Intensity M or LC}/\text{Intensity TBC})$)	53
Figura 7. Diagrama de cajas que representa la expresión diferencial ajustada de proteínas entre derrame pleural maligno y tuberculoso	54
Figura 8. Análisis multivariante supervisado de la expresión diferencial de la intensidad de las proteínas en escala logarítmica en base 2 para la comparación entre derrame pleural maligno y tuberculoso	56
Figura 9. Árbol de clasificación condicional de las proteínas diferenciales entre derrame pleural maligno y tuberculoso	57
Figura 10. Heatmap de intensidad relativa de expresión proteica para las muestras de DP de pacientes diagnosticados de ADC vs. MPM. Análisis de proximidad de expresión relativa entre muestras y proteínas	59
Figura 11. Correlación lineal de la expresión de proteínas entre derrame pleural secundario a adenocarcinoma y mesotelioma pleural maligno	60

Figura 12. Proteínas con expresión diferencial ajustada entre adenocarcinoma y mesotelioma pleural maligno	61
Figura 13. Análisis multivariante supervisado de la expresión diferencial de la intensidad de las proteínas en escala logarítmica en base 2 para la comparación entre adenocarcinoma y mesotelioma pleural maligno	62
Figura 14. Árbol de clasificación de las proteínas diferenciales entre adenocarcinoma y mesotelioma pleural maligno	63
Figura 15. Heatmap de intensidad relativa de expresión proteica para las muestras de DP de pacientes diagnosticados de linfoma vs. TBC. Análisis de proximidad de expresión relativa entre muestras y proteínas	65
Figura 16. Correlación lineal de la expresión de proteínas entre derrame pleural secundario a linfomas y tuberculosis	66
Figura 17. Proteínas con expresión diferencial ajustada entre linfoma vs. TBC	67
Figura 18. Análisis multivariante supervisado de la expresión diferencial de la intensidad de las proteínas en escala logarítmica en base 2 para la comparación entre linfoma y tuberculosis	68
Figura 19. Árbol de clasificación de las proteínas diferenciales entre linfomas y tuberculosis	69
Figura 20. Árbol de clasificación óptimo de las proteínas diferenciales entre adenocarcinoma vs. mesotelioma pleural maligno en la cohorte de validación	73

Agradecimientos

Quiero agradecerle a José Manuel Porcel su constante dedicación a su profesión y su vocación investigadora que propicia el deseo de aprender en mí. Sus conocimientos y su manera de trabajar han sido fundamentales para realizar este trabajo.

A Antonieta Salud, su interés por mi formación MIR; por transmitirme sus conocimientos e interés por la oncología digestiva.

A Aureli, por su inestimable e incansable ayuda en el procesamiento de las muestras.

A Montse, por buscarme un hueco y por su paciencia para realizar los cálculos estadísticos.

A Silvia, compañera y amiga. Por su apoyo, por sus incansables ganas de investigar y por el arduo trabajo de mantener actualizada la base de datos. Sin ellos, no hubiera podido realizar este trabajo.

Han sido muchas las personas e instituciones que han participado en mi formación: colegio, universidad, centros de trabajo de Ontinyent, Lleida, Madrid y Reus... Gracias a vosotros: maestros, profesores y compañeros de clase u hospital. Me habéis enseñado a aprender y a forjarme como persona. A las "chicas de medicina", Lucía, Rosa, Isabel, Alba, Pat, Blanca y demás amigos, por todos los momentos compartidos.

Estoy especialmente agradecida al Servicio de Oncología de Lleida. A Ramón, Serafín, María, Santi, Jaume, Antonio Llombart, Diego, Euge, Elena, Noe, Juan Carlos, Ariadna, Pipe, Carmeta, Aurora, Guille, enfermeras y a los "chicos de ensayos". Gracias por preocuparos por mi formación humana y profesional; por transmitirme la vocación por la atención a la persona, por amenizar las horas de trabajo compartidas y ,sobre todo, gracias por la amistad sincera que me habéis brindado algunos de vosotros.

A Kepa, Mireia y Pau, por abrirme la puerta de su casa y por su cercanía.

A Isabel, Cristina y Marc, por acompañarme en el camino de la vida.

A toda mi gran familia por su amor incondicional. En especial a mis padres, por ser una fuente de apoyo constante, por su insistencia en la importancia de mi formación; sin su empeño, no sería yo hoy oncóloga. Y a mis hermanas, compañeras de camino, que han sabido estar presentes siempre que las he necesitado.

Y por último, a Antonio, por hacerme feliz y por apoyarme en todos mis proyectos.

Abreviaciones

2D-PAGE: Electroforesis bidimensional en gel de poliamida

Ac: Anticuerpo

ADA: Adenosina desaminasa

ADC: Adenocarcinoma de pulmón

AUC: Área bajo la curva

CA: Antígeno carbohidrato

CEA: Antígeno carcinoembrionario monoclonal

CK: Citokeratinas

CPNM: Carcinoma pulmonar no microcítico

CS: Condroitin sulfato

CYFRA: Fragmento de citokeratina

DE: Desviación estándar

DIGE: Gel fluorescente de electroforesis

DP: Derrame pleural

DPM: Derrame pleural maligno

EGFR: Factor de crecimiento epidérmico

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FDR: False discovery rate (Descubrimiento de falsos positivos)

FGF: Factor de crecimiento del fibroblasto

GAG: Glucosaminglicano

HCG: Gonadotropina coriónica humana

IC: Intervalo de confianza

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

LDH: Lactatodeshidrogenasa

Log: Logaritmo

LP: Líquido pleural

MMP: Metaloproteinasas

MPM: Mesotelioma pleural maligno

MT: Marcadores tumorales

NSE: Enolasa específica de las neuronas

PCR: Proteína C reactiva

PDEF: Pigmento derivado del factor epitelial

PSA: Antígeno prostático específico

ROC: Curva de eficacia diagnóstica

TC: Tomografía computarizada

VCAM: Molécula de adhesión vascular celular

TBC: Tuberculosis

uPA: Activador de plasminógeno de tipo uroquinasa

Resumen

Fundamento:

El diagnóstico del derrame pleural maligno puede ser difícil. La citología del líquido pleural (LP) tiene una sensibilidad limitada y la diferenciación entre mesotelioma maligno (MPM) y adenocarcinoma (ADC) pulmonar, así como entre linfoma y linfocitosis reactiva (p.ej. tuberculosis –TBC–) puede ser compleja. Por otro lado, las características bioquímicas del LP son similares (exudado linfocitario) en el linfoma y en pacientes tuberculosos. Incluso, se pueden observar concentraciones pleurales elevadas de adenosina desaminasa (ADA), un marcador de TBC, en sujetos con derrames pleurales (DP) secundarios a linfoma.

Objetivo:

El objetivo de este estudio fue descubrir “perfiles proteómicos” en el LP –mediante su análisis en una micromatriz con 120 anticuerpos–, que pudieran discriminar entre: 1) DP malignos de benignos, 2) ADC pulmonar de MPM, 3) linfomas con elevación pleural de ADA de TBC.

Metodología:

Utilizamos una micromatriz con 120 biomarcadores proteínicos relacionados con tumores (Whatman Serum Biomarker Chip®, Sanford, EEUU) sobre sobrenadantes de LP (previamente almacenados y congelados) pertenecientes a 71 pacientes (29 pacientes con MPM, 29 con ADC pulmonar y 12 con linfoma y concentraciones elevadas de ADA pleural). La abundancia relativa de los 120 biomarcadores entre dichas muestras y muestras control de 35 sujetos con DP secundario a TBC nos permitió establecer, tras realizarse un análisis bioinformático, una huella molecular

(perfil proteómico) para los diferentes grupos etiológicos. Los datos obtenidos fueron posteriormente validados mediante técnicas de ELISA en una cohorte independiente de 102 pacientes.

Resultados:

El análisis de la expresión de los 120 biomarcadores nos permitió seleccionar algunos de ellos para diferenciar:

- 1) Entre DPM y DP benigno, una combinación de 4 proteínas (proteína C-reactiva, metaloproteinasa-9 (MMP-9), condroitín sulfato (CS) y catepsina B) alcanzó una sensibilidad del 94,9% y una especificidad del 84,7%. En la cohorte de validación, un sistema de puntuación (score) con la combinación de estas 4 proteínas alcanzó una sensibilidad del 95% y especificidad del 100% para identificar DP malignos.
- 2) Entre el ADC y el MPM, en la cohorte de derivación, una combinación de 4 proteínas (CA15.3, CA19.9, kalicreína 12 y MMP-3) demostró una sensibilidad de 82,8% y una especificidad del 89,7%. En la cohorte de validación, se obtuvo una puntuación que combinó CA19.9, kalicreína 12 y CA15.3 y obtuvo una sensibilidad del 65% y una especificidad del 100% para diferenciar ADC de MPM.
- 3) La catepsina B, en la cohorte de derivación, fue capaz de discriminar entre el DP secundario a linfoma con altos niveles de ADA de la tuberculosis con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 83,3%. En la cohorte de validación, esta proteína no fue significativa por tener baja especificidad para clasificar bien a los tuberculosos (62%) a pesar de su alta sensibilidad (95%).

Conclusiones:

La combinación de 4 proteínas (PCR, MMP-9, CS y catepsina B), medidas en el LP, diferenció con una sensibilidad y especificidad superiores al 80% entre el DPM y DP benigno. Otras 3 proteínas (CA19.9, kalikreína y CA15.3) son eficaces para diferenciar

entre ADC pulmonar de MPM. La catepsina B está sobreexpresada en los DP secundarios a TBC pero no se confirmó como marcador diagnóstico de forma aislada.

Summary

Background:

The diagnosis of a malignant pleural effusion can be difficult. Pleural fluid cytology has a limited sensitivity and the differentiation between adenocarcinoma (ADC), mesothelioma or benign reactive mesothelial cells could be complicated. Moreover, the biochemical features of the pleural fluid are similar (lymphocytic exudate) in lymphoma or tuberculous patients. Even, high adenosine deaminase (ADA) pleural fluid levels, a biomarker of tuberculosis, have been described in patients with a lymphoma.

Objectives:

The aim of this study is to detect protein profiles in pleural fluids that could be used to differentiate: 1) malignant from benign pleural effusion 2) lung ADC from mesothelioma; 3) lymphoma with high pleural fluid ADA levels from tuberculosis. Pleural fluids were analyzed in a microarray chip with 120 arrayed antibodies.

Methodology:

We performed a high-density, single-capture array of protein biomarkers related to cancer (Whatman Serum Biomarker Chip®, Sanford, EEUU) on stored pleural fluid supernatants from 71 patients (30 mesothelioma, 29 lung ADC and 12 lymphoma with high pleural ADA activity). The relative abundance of the 120 biomarkers between these samples and those from 35 patients with pleural tuberculosis (paired controls) enabled to pattern the molecular signature (protein profile) of the different etiologic groups. A bioinformatic analysis was used in the interpretation of the microarray data. The data obtained were subsequently validated in an independent cohort.

Results:

Expression analysis of the 120 biomarkers allowed us to select some of them to differentiate:

- 1) Between malignant and benign pleural effusion, a combination of 4 proteins (C-reactive protein, MMP-9, CS and Cathepsin B) had a sensitivity of 94.9% and a specificity of 84.7%. Afterwards, the results were validated by ELISA methods obtaining a score with the combination of the 4 proteins that reached 95% of sensitivity and 100% of specificity.
- 2) Between ADC and mesothelioma, a combination of 4 proteins (CA15.3, CA19.9, kallikrein 12 and MMP-3) demonstrated a sensitivity of 82.8% and a specificity of 89.7%. In the validation cohort, we obtained a score that combined CA19.9, kallikrein and CA15.3 and had a sensitivity of 65% and a specificity of 100%.
- 3) Cathepsin B, in the derivation cohort was able to discriminate between pleural effusion secondary to lymphoma with high ADA levels from tuberculosis, with a sensitivity of 100% and a specificity of 83.3%. In the validation cohort, cathepsin B obtained a sensitivity of 62% and a specificity of 95%.

Conclusions:

A combination of 4 proteins (C-reactive protein, MMP-9, CS and Cathepsin B) differentiates with a sensitivity and a specificity above 80%, malignant to benign pleural effusion. Other 3 proteins (CA19.9, kallikrein and CA15.3) are useful to identify ADC vs. mesothelioma. Cathepsin B allows us to differentiate between lymphoma and tuberculosis but was not confirmed as a single marker between tuberculosis and lymphoma.

Resum



Fonament:

El diagnòstic del vessament pleural maligne pot ser difícil. La citologia del líquid pleural (LP) té una sensibilitat limitada i la diferenciació entre mesotelioma maligne (MPM) i adenocarcinoma (ADC) pulmonar, així com entre limfoma i limfocitosi reactiva (p.ex. tuberculosi -TBC-) pot ser complexa. D'altra banda, les característiques bioquímiques del LP són similars (exsudat limfocitari) en el limfoma i en pacients tuberculosos. Fins i tot, es poden observar concentracions pleurals elevades d'adenosina desaminasa (ADA), un marcador de TBC, en subjectes amb vessaments pleurals (DP) secundaris a limfoma.

Objectius:

L'objectiu d'aquest estudi va ser descobrir "perfils proteòmics" en el LP -mitjançant la seva anàlisi en una micromatriu amb 120 anticuerpos-, que poguessin discriminar entre: 1) DP malignes de benignes, 2) ADC pulmonar de MPM, 3) limfomes amb elevació pleural d'ADA de TBC.

Metodologia:

Utilitzem una micromatriu amb 120 biomarcadors proteics relacionats amb tumors (Whatman Serum Biomarker Chip® (Sanford, EEUU)) sobre sobrenedants de LP (prèviament emmagatzemades i congelats) pertanyents a 71 pacients (29 pacients amb MPM, 29 amb ADC pulmonar i 12 amb limfoma i concentracions elevades d'ADA pleural). L'abundància relativa dels 120 biomarcadors entre aquestes mostres i mostres control de 35 subjectes amb DP secundari a TBC ens va permetre establir, després de realitzar una anàlisi bioinformàtic, una empremta molecular (perfil proteòmic) per als

diferents grups etiològics. Les dades obtingudes van ser posteriorment validades mitjançant tècniques d'ELISA en una cohort independent de 102 pacients.

Resultats:

L'anàlisi de l'expressió dels 120 biomarcadors ens va permetre seleccionar alguns d'ells per diferenciar:

- 1) Entre DPM i DP benigne, una combinació de 4 proteïnes (proteïna C-reactiva, metaloproteïnasa-9 (MMP-9), condroitina sulfat (CS) i catepsina B) va aconseguir una sensibilitat del 94,9% i una especificitat del 84,7%. En la cohort de validació, un sistema de puntuació (score) amb la combinació d'aquestes 4 proteïnes va aconseguir una sensibilitat del 95% i especificitat del 100% per identificar DP malignes.
- 2) Entre el ADC i el MPM, en la cohort de derivació, una combinació de 4 proteïnes (CA15.3, CA19.9, cal·licreïna 12 i MMP-3) va demostrar una sensibilitat de 82,8% i una especificitat del 89,7%. En la cohort de validació, es va obtenir una puntuació que va combinar CA19.9, cal·licreïna 12 i CA15.3 i va obtenir una sensibilitat del 65% i una especificitat del 100% per diferenciar ADC de MPM.
- 3) La catepsina B, en la cohort de derivació, va ser capaç de discriminar entre el DP secundari a limfoma amb alts nivells d'ADA de la tuberculosi amb una sensibilitat del 100% i una especificitat del 83,3%. En la cohort de validació, aquesta proteïna no va ser significativa per tenir baixa especificitat per classificar bé als tuberculosos (62%) malgrat la seva alta sensibilitat (95%).

Conclusions:

La combinació de 4 proteïnes en el LP (PCR, MMP-9, CS i catepsina B) va diferenciar amb una sensibilitat i especificitat superiors al 80% entre el DPM i DP benigne. Altres 3 proteïnes (CA19.9, cal·licreïna i CA15.3) van diferenciar entre ADC

pulmonar de MPM. La catepsina B està sobreexpressada en els DP secundaris a TBC però no es va confirmar com a marcador diagnòstic de forma aïllada.

Introducción

Introducción

El derrame pleural (DP) es una entidad que se desarrolla cuando la formación de líquido pleural (LP) excede su absorción. Los mecanismos responsables de su formación pueden afectarse, en diferente medida, por diversos procesos patológicos. Por tanto, ante la existencia de un DP deberemos esclarecer su etiología mediante su análisis y el contexto clínico del paciente.

Clásicamente, los DP se dividen en exudados y trasudados –siguiendo los criterios de Light– que permiten identificar exudados pleurales con una sensibilidad alrededor del 95-100% y una especificidad del 70-90% (Light, 2002).

En ocasiones, el LP tiene un patrón bioquímico similar en diversas patologías y es difícil, a priori, su distinción. Cuando el análisis bioquímico del LP muestra un exudado linfocitario (> 50% linfocitos), los diagnósticos principales a considerar son el cáncer y la tuberculosis (TBC).

La prueba estándar para llegar a un diagnóstico es la realización de una toracocentesis. La citología del LP es una prueba con baja sensibilidad que ofrece dificultades para diagnosticar entre diversas entidades patológicas. La sensibilidad en nuestra serie está alrededor del 60% para diagnosticar malignidad (Porcel et al, 2014). En los casos en que con la citología no se llega al diagnóstico, deben emplearse otros métodos diagnósticos como la biopsia pleural guiada por pruebas de imagen o por toracoscopia.

Prevalencia del DP maligno y tuberculoso

En un estudio de 3.077 pacientes (Porcel et al, 2014), el DP secundario a neoplasias representó la causa más frecuente en los pacientes sometidos a una toracocentesis diagnóstica (27%). Le siguen en frecuencia otras etiologías como la insuficiencia cardiaca (21%), neumonía (19%) o TBC (9%).

En un estudio de 840 pacientes con DP maligno (Porcel et al, 2014), se obtuvo confirmación citohistológica en 538 (64%), mientras que los restantes 302 (36%) se consideraron probablemente malignos según criterios clínicos ampliamente aceptados. En aproximadamente la mitad de los pacientes con derrame pleural maligno (DPM), el tumor primario fue pulmonar (37%) y, al menos la mitad, adenocarcinoma (ADC).

A continuación comentamos las entidades seleccionadas para nuestro trabajo.

Mesotelioma pleural maligno

El mesotelioma pleural maligno (MPM) se origina de las células mesoteliales de la cavidad pleural. El pico de incidencia diagnóstica está entre los 50 y los 70 años, siendo más frecuente en varones. Se relaciona en el 80% de los casos con la exposición a asbestos (Montes et al, 2005). Su incidencia es relativamente baja. Oscila entre los 7 casos por millón de habitantes/año en Japón y los 40 en Australia, dependiendo fundamentalmente de la exposición a asbesto en décadas pasadas (Lin et al, 2007). En Europa, se estima la incidencia en 20 casos por millón/año (Rodríguez-Panadero, 2015). La prevalencia de este tumor en nuestra área geográfica es del 3% de todos los DP malignos (Porcel et al, 2014).

El hallazgo radiológico más común en una tomografía computarizada (TC) es un engrosamiento irregular difuso con prominencias nodulares en la pleura, asociado a DP ipsilateral > 50% del hemitórax y con evidencia de pérdida de volumen y ausencia de

desviación del mediastino (Wang et al, 2004). No obstante, la TC es poco sensible para la estadificación de esta enfermedad y resulta más útil la tomografía de emisión de positrones (Sharif et al, 2011). La resonancia magnética proporciona un mejor contraste que la TC para definir la invasión de la pared torácica por el MPM, pero no es capaz de detectar de forma fiable la presencia de enfermedad metastásica (Plathow et al, 2008).

Existen tres tipos de MPM: epiteloide, sarcomatoide y mixto o bifásico. El tipo epitelial es la estirpe más frecuente y supone el 50% del total; el 25% son mixtos, el 15% sarcomatosos y el 10% restante están poco diferenciados (Jett, 2001).

Desde el punto de vista patológico, no existe ningún marcador con una sensibilidad y especificidad del 100% para MPM, y se recurre a los anticuerpos monoclonales.

Adenocarcinoma pulmonar

El cáncer de pulmón es la neoplasia más frecuente y la primera causa de muerte relacionada con cáncer a nivel mundial. En España representa el 12,4% de todos los casos de cáncer y el 20,6% de las muertes por neoplasia en hombres y mujeres (Ferlay, 2012).

El carcinoma no microcítico representa alrededor del 80% de los casos de cánceres de pulmón. El tabaco es el factor de riesgo conocido más importante, siendo el responsable de hasta un 90% de los casos (Thun et al, 2002) y ocasiona un 90% de la mortalidad en el hombre y un 80% en mujeres (Hecht, 1999).

El ADC es el tipo histológico más frecuente en mujeres y en sujetos “no fumadores” de ambos sexos.

En las pruebas de imagen se localizan en el 75% de los casos en la periferia pulmonar. Para su diagnóstico diferencial requiere realización de marcadores inmunohistoquímicos, como el factor de transcripción tiroideo (Ordóñez, 2000).

Linfoma

Es la tercera causa de DP metastático y representa, aproximadamente, el 10% de los DPM (Porcel et al, 2014).

En los linfomas de Hodgkin, la presencia de DP en el momento del diagnóstico es inusual. En el transcurso de la enfermedad, el DP puede presentarse según alguna serie, hasta en el 30% (Das, 2006). En los linfomas no Hodgkin, es más frecuente. En ambos casos, el DP suele ser un exudado, aunque en ocasiones puede producirse un quilotórax.

Rentabilidad de la citología del LP en el DPM

El diagnóstico de DPM se puede establecer con seguridad cuando se detectan células malignas exfoliadas en el LP (Porcel et al, 2009). Desafortunadamente, la sensibilidad de un primer estudio citológico del LP fue sólo del 51% en una serie de 3077 pacientes con DP (Porcel et al, 2014). En 214 pacientes con una primera citología pleural negativa se repitió una segunda, que resultó diagnóstica en 55 (26%) casos. Finalmente, de 52 pacientes con 2 citologías negativas, una tercera muestra fue positiva en 12 (23%) casos. En conjunto, teniendo en cuenta todas las citologías realizadas, la rentabilidad de esta prueba para identificar malignidad fue del 59% (491/831). La rentabilidad de la citología varió según la estirpe histológica del tumor primario, siendo del 66,5% en ADC, del 54,9% en linfomas y de tan solo del 27% en MPM y 25% en carcinomas escamosos de pulmón.

Dificultades para diagnosticar DPM y diferenciarlo de DP producidos por otras patologías

Existen diferentes publicaciones sobre posibles marcadores que diferencien los DP benignos de los malignos, principalmente de marcadores tumorales clásicos (CEA, CA 15-3, CYFRA 21-1, CA 125, CA 19-9, NSE) y sus posibles combinaciones. En la siguiente tabla se expone un resumen de estos artículos.

Tabla 1. Estudios de marcadores tumorales clásicos diferenciales entre DPM y benignos

Estudio	N	Marcador	Sensibilidad	Especificidad
Villena, 1996	207	CA15.3	0,55	0,97
		CEA	0,53	1
		CA19.9	0,2	1
Villena et al, 2003	252	CA15.3	0,49	0,9
		CEA	0,35	1
Alatas et al, 2001	74	CEA	0,52	0,77
		CA19.9	0,36	0,83
		CYFRA21.1	0,91	0,90
Paganuzzi et al, 2001	106	CEA	0,31	0,91
		CYFRA21.1	0,78	0,80
Romero et al, 1996	115	CEA	0,57	0,89
		CA15.3	0,48	0,97
		CYFRA21.1	0,38	0,82
Ferrer et al, 1999	146	CEA	0,40	1
		CA125	0,37	1
		CYFRA 21.1	0,24	1
		SCC	0,05	1
		NSE	1	0,95
Salama et al, 1990	196	CEA	0,56	0,95
		CYFRA21.1	0,51	0,95
Ustun et al, 2004	102	CEA	0,59	0,9
		CA15.3	0,51	0,75
		CA19.9	0,39	0,73
Kuralay et al, 2000	61	CA19.9	0,90	0,97
		CA125	0,95	0,95
		NSE	1	0,95
Porcel et al, 2004	416	CEA	0,29	1
		CA12.5	0,17	1
		CA15.3	0,30	1
		CYFRA21.1	0,22	1
		Combinación	0,54	1

Un metaanálisis (Liang et al, 2008), que incluía 29 estudios, valoró la sensibilidad y especificidad de algunos de estos marcadores (CA 125, CA 15-3, CA 19-9 y 21-1 CYFRA) y sus combinaciones. Sus conclusiones se resumen a continuación.

Tabla 2. Resumen de los resultados sobre sensibilidad y especificidad de los marcadores tumorales clásicos determinados en líquido pleural en el metaanálisis de Liang et al (2008)

Marcador	Nº estudios	N DPM/no DPM	Sensibilidad	Especificidad
CA 12.5	10	512/801	0,48	0,85
CA 15.3	11	819/966	0,51	0,96
CA 19.9	7	598/488	0,25	0,96
CYFRA 21.1	18	1152/1122	0,55	0,91
CEA+ CA 12.5	3	107/167	0,65	0,98
CEA+ CA15.3	3	208/366	0,66	0,98
CEA+ CA19.9	1	65/142	0,46	1
CEA+ CYFRA 21.1	3	97/115	0,72	0,95
CA12.5+ CA19.9	1	19/42	0,95	0,98
CA12.5+ CYFRA 21.1	2	115/133	0,66	0,96
CA15.3+ CA19.9	1	65/142	0,62	0,97
CA15.3+ CYFRA 21.1	2	87/109	0,83	0,95
CEA+ CA12.5+ CYFRA21.1	1	43/79	0,65	1
CEA+ CA15.3+ CA19.9	1	65/142	0,71	0,97

DPM: derrame pleural maligno.

Por tanto, observamos que no existe ningún marcador suficientemente preciso. La combinación de dos o más marcadores tumorales aumenta la sensibilidad diagnóstica.

Dificultades para diagnosticar MPM y diferenciarlo del ADC metastásico

La escasa ayuda del análisis citológico del LP para identificar MPM reside en la dificultad de diferenciar entre células mesoteliales normales, reactivas y atípicas (malignas). Distinguir MPM de ADC metastásico pleural es uno de los mayores retos para el patólogo. La inmunohistoquímica se ha convertido en una herramienta esencial. Actualmente, existen algunos marcadores con una excelente sensibilidad y especificidad para distinguir entre el MPM epitelial y ADC metastático; pero con menor precisión para distinguir entre otros tumores malignos epiteliales o para el MPM con componente sarcomatoso.

Las diferencias de expresión proteica entre el MPM y el ADC que pueden ayudar a discriminar entre ambas patologías, se resumen en la tabla 3 (Porcel, 2013). Sin embargo, no hay acuerdo en cuál sería la mejor combinación para llegar con la mayor precisión posible a diferenciarlas.

Tabla 3. Diferencias proteicas por inmunohistoquímica entre mesotelioma pleural maligno y adenocarcinoma

Marcador	Mesotelioma	Adenocarcinoma
Calretinina	Positiva	Negativa
CK 5/6	Positiva	Negativa
WT-1	Positiva	Negativa
Mesotelina	Positiva	Negativa
HBME-1	Positiva	Negativa
Podoplanina	Positiva	Negativa
D2-40	Positiva	Negativa
CEA	Negativa	Positiva
MOC-1	Negativa	Positiva
Ver-EP4	Negativa	Positiva
Leu-M1 (CD15)	Negativa	Positiva
B72.3	Negativa	Positiva
BG8 (Lewis)	Negativa	Positiva
TTF-1	Negativa	Positiva
Napsina A	Negativa	Positiva
Receptor estrógenos (RE-1D5)	Negativa	Positiva

En los últimos años, se han identificado dos nuevos biomarcadores: la mesotelina y la fibulina, que podrían ayudar en el diagnóstico diferencial.

La fibulina-3 se sobreexpresa más en el MPM que en el mesotelio normal. Hay estudios que demuestran que su determinación en el LP alcanza una sensibilidad del 84% y una especificidad del 93% para diagnosticar MPM (Pass HI et al, 2012). También se ha descrito como marcador pronóstico independiente de supervivencia en pacientes con MPM (Creaney et al, 2014) con una Hazard Ratio (HR) 2,08 (1,14-3,82), $p = 0,017$. Los pacientes con niveles bajos (<467 ng/mL) sobreviven más tiempo que aquellos con niveles por encima de la media (14,1 meses vs. 7,9 meses, $p = 0,012$).

Respecto a la mesotelina, en 2014 se publicó un metaanálisis (Cui et al, 2014) que analizaba la mesotelina soluble en plasma y DP como marcador diagnóstico para el MPM. Los resultados de los diferentes estudios incluidos en el metaanálisis se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de los estudios incluidos en el metaanálisis de Cui et al (2014) sobre mesotelina en líquido pleural

Estudio	N	Punto corte (nmol/L)	Sensibilidad	Especificidad
Scherperel et al	92	10,4	0,77	0,69
Davies et al	166	20,0	0,71	0,90
Fujimoto et al	96	8,0	0,70	0,68
Yamada et al	98	10,0	0,80	0,83
Ashour et al	74	3,0	0,73	0,81
Blanquart et al	101	24,05	1	0,65
Amany et al	40	3,5	0,95	0,90
Canessa et al	275	9,3	0,73	0,88
Creaney et al	98	20,0	0,70	0,95
Filiberti et al	177	12,0	0,74	0,86
Hooper et al	193	20,0	0,72	0,88

La sensibilidad en el metaanálisis no fue tan alta como se esperaba: sensibilidad 0,79 y especificidad 0,85. La mesotelina soluble puede ser útil para confirmar el MPM si

los resultados son superiores al punto de corte, pero la baja sensibilidad limita su valor diagnóstico para el MPM.

Dificultades para diferenciar TBC de DPM con falsas elevaciones de ADA pleural

El diagnóstico de TBC pleural es seguro cuando se aísla *Mycobacterium tuberculosis* en esputo, LP o espécimen de biopsia pleural. Estas pruebas son, sin embargo, poco sensibles (52%, 37% y 56% respectivamente) y sus resultados tardan de 6 a 8 semanas, por lo que no son prácticas para tomar decisiones clínicas (Porcel, 2009).

El diagnóstico de pleuritis tuberculosa es probable si se detectan granulomas en una pieza de biopsia pleural (80%) o si el paciente tiene un exudado linfocitario con concentraciones elevadas de ADA (>35 U/L) (Porcel, 2009).

Un metaanálisis que incluyó 63 estudios (Liang QL et al, 2008), encontró que la sensibilidad media de la ADA pleural fue del 92% y la especificidad del 90% para identificar DP tuberculoso. La ADA pleural es aceptada como marcador de TBC en el LP en áreas con una prevalencia moderada (p. ej. España) o alta de la enfermedad.

Algunos exudados linfocitarios no TBC pueden tener concentraciones de ADA en LP superiores a 40 U/L (Porcel, 2009), como los DP malignos (5%), especialmente linfomas, y los DP reumatoides. Esto, sumado a la baja rentabilidad del estudio citológico del LP en pacientes con linfoma (es difícil distinguir linfocitos atípicos de reactivos a procesos benignos), plantea un problema clínico real, de difícil solución salvo que se opte por técnicas invasivas como la biopsia pleural.

Porcel y Vives (2003) propusieron dos modelos para el diagnóstico de los DP secundarios a TBC para diferenciarlos de DPM. Para el diagnóstico de TBC, sugirieron un primer modelo (tabla 5) con una sensibilidad del 95% y especificidad del 94% que

incluye dos variables bioquímicas (ADA y hematíes en DP) y dos variables clínicas (edad y temperatura).

Tabla 5. Variables del modelo 1 del score para detectar TBC en DP en el estudio de Porcel & Vives (2003)

Variables modelo 1	Puntuación	Resultados score
ADA LP > 40 U/L	5 puntos	> 5: Tuberculosis 3-5: diagnóstico incierto < 2: derrame pleural maligno
Edad < 35 años	2 puntos	
Temperatura ≥ 37,8°C	2 puntos	
Hematíes LP ≤ 5·10 ⁹ L	1 punto	

El segundo modelo incluye tres variables bioquímicas (ratio LDH LP/Suero, proteínas en LP y hematíes en LP) y tres variables clínicas (ausencia de historia personal de cáncer, edad y temperatura) (tabla 6). Este modelo alcanzó una sensibilidad del 97% y especificidad del 91% para detectar TBC.

Tabla 6. Variables modelo 2 del score para diagnosticar TBC pleural en el estudio de Porcel & Vives (2003)

Variables modelo 2	Puntuación	Resultados score
No historia de enfermedad maligna	3 puntos	≥ 6: Tuberculosis
Edad < 35 años	2 puntos	
Temperatura ≥ 37,8°C	2 puntos	≥ 8 : Tuberculosis ≤ 4: Malignidad (clasifica correctamente 75% de los DP)
Hematíes LP ≤ 5·10 ⁹ L	1 punto	
LP/S LDH ratio ≥ 2,2	1 punto	
Proteínas LP ≥ 50 g/L	1 punto	

Proteómica del líquido pleural

Conceptos generales

La proteómica implica la identificación y cuantificación –en líquidos biológicos o tejidos– de proteínas celulares, que se expresan en cualquier proceso patológico, con la finalidad de descubrir marcadores biológicos de la enfermedad que puedan emplearse para el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de la misma. No existe una única proteína que defina un estado patológico; por lo que será una combinación de varios biomarcadores proteicos (“perfil” o “huella”) la que ayudará al diagnóstico de la enfermedad (Cordero et al, 2008).

Para que un perfil proteómico sea considerado un buen biomarcador, debe ser lo más específico posible de una determinada enfermedad y poseer una utilidad clínica superior a la de otros marcadores que ya se utilicen.

Tecnologías proteómicas

Los estudios proteómicos utilizan dos planteamientos tecnológicos:

1. La combinación de una técnica de separación de proteínas (p. ej. 2D-PAGE, DIGE) con un método de identificación de las proteínas separadas (p. ej. MALDI-TOF).
2. Las micromatrices proteínicas (p. ej. *protein arrays*, SELDI-TOF) (González-Buitrago et al, 2008).

La elección de una metodología concreta para estudiar biomarcadores dependerá de los objetivos del estudio, del número de muestras y de la disponibilidad y familiaridad con una determinada tecnología (Thongboonkerd, 2007).

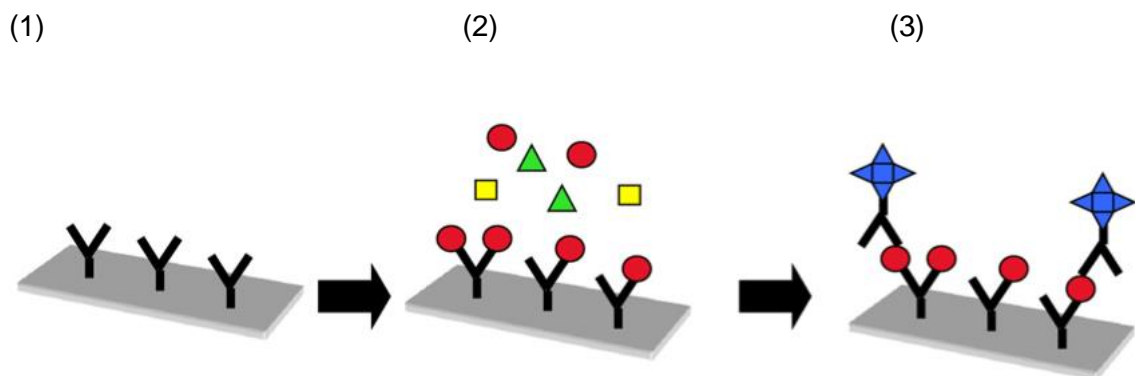
En la estrategia de micromatrices proteínicas se inmovilizan moléculas (p. ej. anticuerpos monoclonales) sobre una superficie de soporte, que van a actuar como

captoras de las proteínas que quieren detectarse. La incubación de la micromatriz con las muestras produce la unión que, posteriormente, se pone de manifiesto utilizando métodos de marcaje fluorescentes, calculándose la concentración relativa de proteína capturada de la muestra (figura 1).

Se utilizaron, en el presente estudio, micromatrices proteínicas tipo *forward-phase*, en la que se inmovilizan los biomarcadores de reconocimiento en la superficie del microarray para poder detectar múltiples parámetros en la misma muestra.

Sus principales ventajas son su aplicabilidad clínica, reforzada por la selección de un chip comercializado que contiene biomarcadores de cáncer (Borrebaeck et Wingren, 2007; Caiazza et al, 2009).

Figura 1. Representación del mecanismo de acción de las micromatrices



- (1) Unión del Anticuerpo (Ac) a la membrana
- (2) Añadir la muestra del paciente a la matriz. El Ac se une a la proteína estudiada.
- (3) Añadir el Ac marcado para detectar la proteína que se desea estudiar.

Estudios de proteómica del LP

Cada vez existen más estudios de identificación de biomarcadores (aislados o en panel) a través de tecnologías proteómicas para el diagnóstico, pronóstico o predicción de respuestas terapéuticas en pacientes con patología pleural (Soltermann et al, 2008; Lehtio & De Petris, 2010).

La concentración de los marcadores proteicos en sangre puede verse afectada por el aclaramiento renal y paso hepático (Soltermann et al, 2008) mientras que el DP, debido a su proximidad a las células tumorales, presenta un mayor enriquecimiento proteico y por tanto, puede ser fuente de marcadores más específicos (Pernemalm et al, 2009). Existe, por tanto, posibilidad de aplicar *microarrays* de proteínas (marcadores inmunohistoquímicos) sobre el bloque celular obtenido de centrifugar el LP (Pu et al, 2008). Otros estudios ofrecen información sobre la composición proteica de los DP, utilizando 2D-PAGE (Tyan et al, 2005).

Los estudios más relevantes publicados en los últimos años sobre proteómica en DP se recogen en la tabla 7.

Tabla 7. Resumen de los estudios más relevantes publicados sobre proteómica en el derrame pleural

Estudio	Tecnología proteómica		Identificación proteica			Población	Comentarios
	Separación	Identificación y validación	N	Validado	Otros		
Bard et al, 2004	1D GE Prefraccionamiento	MALDI-TOF	53	MHC clase II HSP-90 M, A, E.	Células B BTG1, PEDF Bacaman Trombospondina2	4 MPM 5 DP metastásicos	Composición proteica de los exomas. Más abundante las Ig y proteínas del complemento.
Tyan et al, 2005	2D GE	LC-MS	124	Cadena fibrinógeno B Apolipoproteína A1 Clusterin Gelsolin Hemopexina		43 DP de ADC pulmonar	Descripción de perfiles proteómicos del DP maligno
Hsieh et al, 2006	Prefraccionamiento 2D GE	MALDI-Q-TiF Inmunoblot ELISA	7	PEDF	Precusores del fibrinógeno	4 DP malignos y 12 trasudados	Valorar PEDF inferiores en DP maligno que en trasudados
Hegmans et al, 2009	Prefraccionamiento	SELDI-TOF Arrays proteicos	89	Mesotelina	Apolipoproteína C1	41 MPM 48 DP malignos no MPM y benignos	Valorar Apo C1 para discriminar MPM Descripción perfil proteico MPM
Perneimain et al, 2009	Prefraccionamiento	MALDI-TOF/TOF-SM Western blot	6	NPC2	Serpina 1 VCAM-1 Gelsolin CLEC3B Cystatin C precursor EFEMP-1 Keratina α -2 macroglobulina	3 ADC 3 DP inf	NPC2 podría discriminar ADC No hay diferencias en la expresión proteica del DP y suero
Rodríguez-Piñeiro et al, 2010	Prefraccionamiento 1D GE 2D GE DIGE	MALDI-TOF Inmunoblot	35	PEDF	Complemento C3 Gelsolina Apolipoproteína A1 Hemopexina Fibrinógeno β S100 A9 S100 A8	4 ADC pulmón 4 TBC	PEDF se sobreexpresa en DP maligno
Yu et al, 2011	Prefraccionamiento 1D GE	LC-MS Inmunoblot ELISA	482	A-2-HS Glicoproteína IGFBP2 Angiogenina Cistatina C	PEDF S100 A9 S100 A8 Apolipoproteína E Clusterin	68 DPM 119 no DPM	Los niveles de AHSG and IGFBP2 estaban aumentados en DPM
Hosako et al, 2012	DIGE	LC-MS Inmunoblot Arrays proteicos	282	14.3.3 proteina sigma Proteína 90 Heat shock Annexina A1 Catepsina D Ceruloplasmina Mimexan Piruvato deshidrogenasa	Apolipoproteína E Fibrinógeno β Chain Gelsolina PEDF S 100 A0 Calretinina	10 DPM 33 DP metastásico (11 ADC, 13 escamoso pulmón, 3 c. pleomórficos pulmón, 6 sarcomas sinoviales)	La expresión de Catepsina D es menor en MPM que ADC pulmonar.
Wang et al, 2012	2D DIGE	MALDI-TOF MS Inmunoblot	28	Hemopexina Gamma fibrinógeno Transtiretina Proteína sérica amiloide JMJ5 Fibrinógeno γ	Complemento C3 PDEF Clusterin S100A9 Fibrinógeno	10 ADC pulmón 10 benignos (6 TBC, 4 neumonías)	Hemopexina, transtiretina y fibrinógeno γ están elevados en DPM y JMJ5 y la proteína sérica amiloide disminuidos en DPM vs DP benignos.
Li et al, 2015	1D-SDS-PAGE	4G UHR TOF ELISA	6	IL-1 α	CATSPER 1 IL-1 α Miosina A1	3 DP CPNM 3 TBC	La IL-1 se sobreexpresa en CPNM y permite su diferenciación
Liu et al, 2015	1D-SDS-PAGE	LC-MS Western blot ELISA	405	Factor crecimiento receptor hepatocito Dipeptidyl peptidasa IV Receptor tirosina-fosfatasa F		20 ADC pulmón (10 DPM y 10 DPPM) 10 C. mama 10 C. gástrico 10 TBC 10 Neumonías	Los niveles de expresión son mayores en el DPM de ADC pulmonar

El objetivo de los estudios presentados es encontrar huellas proteómicas capaces de diferenciar las entidades estudiadas.

Todavía son pocos los estudios realizados y no se ha establecido una combinación suficientemente sensible y específica que haya podido ser validada y de utilidad en la práctica clínica habitual.

La importancia de estos perfiles proteómicos radica en la posibilidad de descartar malignidad en aquellos pacientes que no son candidatos a medidas más agresivas.

Justificación del estudio

Del texto previo se pueden establecer las siguientes afirmaciones, que constituyen la base sobre la que se justifica el presente estudio:

1. Es difícil diagnosticar por métodos no invasivos un DP secundario a MPM o linfoma, debido a la escasa rentabilidad de la citología del LP.
2. Es difícil diferenciar –mediante el estudio citológico del LP– un MPM de un ADC, así como un linfoma de un proceso benigno (TBC) caracterizado por una linfocitosis pleural reactiva.
3. Un porcentaje significativo de linfomas presentan actividad elevada de ADA pleural (falsos positivos), enzima que se utiliza para el diagnóstico no invasivo de la TBC pleural.
4. El empleo de un tipo de micromatriz proteínica (*single-capture antibody microarrays*) que contenga numerosos biomarcadores de cáncer podría tener aplicabilidad clínica para el diagnóstico diferencial del DP. Además, no requiere del equipamiento especializado de otras tecnologías proteómicas. En cualquier caso, no existen estudios previos.

Hipótesis

1. Es muy improbable encontrar un único biomarcador en el LP relacionado con una etiología concreta de DP.
2. La combinación de diferentes biomarcadores proteicos (panel) puede alcanzar niveles elevados de sensibilidad y especificidad. La existencia de un “perfil proteómico” distinto en DPM y DP secundario a tuberculosis y entre ADCs metastásicos y MPM podría permitir establecer un diagnóstico diferencial preciso en la práctica clínica.
3. La tecnología proteómica de micromatrices proteínicas (*protein microarrays*) podría aventajar a otros procedimientos, por su potencial aplicabilidad clínica.
4. Las proteínas seleccionadas por las micromatrices pueden conservar su eficacia discriminatoria si se miden por tecnología más asequible en la práctica clínica.

Objetivos

1. Conocer si la combinación de un número restringido de proteínas puede proporcionar un diagnóstico diferencial entre el DPM y DP benigno.
2. Conocer si el “perfil proteómico” del LP en los pacientes con DP secundario a ADC es diferente del que exhiben los sujetos con MPM.
3. Conocer si los pacientes con DP secundario a linfoma que tengan actividad elevada de ADA en el LP pueden distinguirse de los pacientes con TBC pleural mediante el análisis de los “perfiles proteómicos” del LP.
4. Validación de los resultados obtenidos mediante una técnica cuyo costo- eficacia y posibilidad de uso en la práctica clínica sea mayor que la técnica de la matriz de microarrays.

Material y métodos



Diseño

Realizamos un estudio de casos y controles sobre una serie retrospectiva de DP extraídos de una base de datos y de un biobanco de LP mantenidos de forma prospectiva en el Hospital Arnau de Vilanova de Lleida entre enero de 2001 y diciembre de 2013. Además disponemos de otra base de datos, con muestras de 77 MPM incluidos en nuestro biobanco, procedente del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla, recogidos entre enero de 1988 y diciembre de 2007. Las muestras de los pacientes del presente estudio están comprendidas entre 2001 y 2013 en ambas cohortes.

Todos los pacientes han firmado un consentimiento donde se especifica que se guardará una muestra de LP para futuras investigaciones.

Población de estudio

Para el presente estudio, seleccionamos aleatoriamente de nuestro biobanco el LP de 29 sujetos con MPM (11 del H. Virgen del Rocío y 18 del H. Arnau de Vilanova), 29 con ADC de pulmón, 35 con TBC y 12 con linfoma y actividad de ADA pleural elevada (> 35 U/L). Por consiguiente, la población del estudio de derivación se constituyó por un total de 105 pacientes.

Los DPM secundarios a MPM, ADC de pulmón o linfoma se diagnosticaron por la presencia de células malignas en el LP o en tejido pleural obtenido por biopsia.

Los DP secundarios a TBC procedían de pacientes con diagnóstico definitivo de TBC o con alta sospecha clínica. La confirmación implicaba el aislamiento del *Mycobacterium tuberculosis* en esputo, LP o espécimen de biopsia pleural. Consideramos que cumplían criterios de diagnóstico clínico de TBC aquellos pacientes

sin confirmación mediante biopsia o cultivo pero con datos del LP concordantes con exudados linfocitarios con ADA elevada, con alta sospecha por la clínica o cuya evolución fue favorable tras la administración de tratamiento antituberculoso. Se excluyeron otras causas potenciales de DP.

Para la cohorte de validación seleccionamos 30 pacientes diagnosticados de ADC de pulmón (20 de ellos utilizados en la comparación frente a MPM y 10 en la comparación de DPM y benignos), 20 MPM (que se compararon con los ADC; 5 de ellos se incluyeron en el análisis de DPM vs. benignos) y 18 linfomas (5 se usaron para la comparación de DPM vs. benigno y los otros 13 se compararon con la población de TBC). Formaron parte como grupo control 34 muestras de DP tuberculosos confirmados o probables (según los criterios redactados anteriormente).

Variables

Las variables del estudio incluidas fueron datos demográficos (edad, sexo), métodos de diagnóstico, características bioquímicas del LP (exudado o trasudado según criterios de Light, recuento diferencial de leucocitos y concentraciones de ADA) y abundancia relativa de los 120 biomarcadores que se evaluaban en la micromatriz. La tabla 8 detalla la composición de las 120 proteínas presentes en el kit (en el que se substituyó el PSA libre por la mesotelina).

Tabla 8. Listado de proteínas evaluadas en la población de derivación

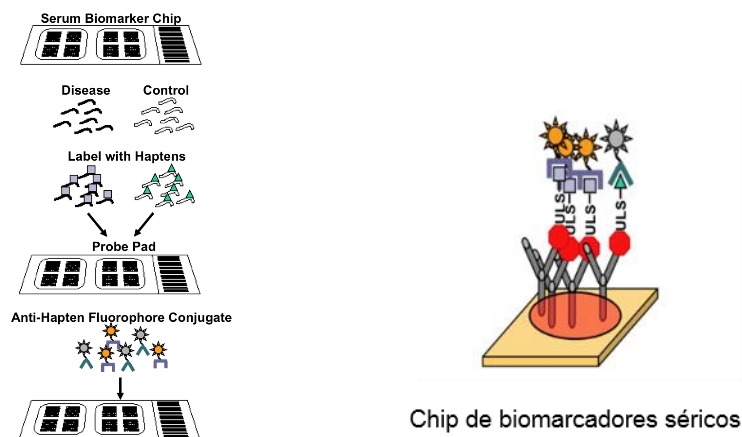
Activador del plasminógeno uroquinasa	E- selectina	Gonadotropina coriónica β	IL-6	MCP-4	Tetranectina
Albumina sérica	Enolasa específica neuronal	Haptoglobulina	IL-7	M-CSF	TGF- α
Angiogenina	Eotaxina	Hemoglobina	IL-8	Mieloperoxidasa	TGF- β
Angiopoyetina-2	ErbB2	I-10	IL-9	Mioglobina	TIMP1
Angiostatina	Factor de crecimiento	ICAM-1	Inhibidor del activador del plasminógeno	MIP-1- α	TIMP2
Antígeno carcinoembrionario (específico grupo 2)	Factor de crecimiento de hepatocitos	Ig A	Inhibidor de tripsina asociado al tumor	MMP-2	Tiroglobulina
Antígeno carcinoembrionario (específico grupo 4)	Factor de crecimiento de insulina	Ig G	Insulina	MMP-3	Tirosinasa
Apolipoproteína A1	Factor de crecimiento epidérmico	Ig M	Interferon- γ	MMP-9	TNF- α
Apolipoproteína J	Factor de crecimiento fibroblastos- básico	IL-12p40	IP-10	Osteopontina	TNF- β
β 2 microglobulina	Factor de crecimiento fibroblastos-7	IL-12p70	Kalitreína-12	PDGF (todas isoformas)	Transferrina
CA 125	Factor de crecimiento insulina factor de unión 3	IL-13	Kalitreína-14	PDGF(isoforma BB)	Trombopoyetina
CA 15-3	Factor de Von Willebrand	IL-17	Kalitreína-5	Plasminógeno	Trombospondina-1
CA 19-9	Fas	IL-1- α	Kalitreína-9	Proteína C reactiva	VCAM-1
Catepsina B	Ferritina	IL1- β	Laminina	PSA-ACT complejo	VE- cadherina
Ceruloplasmina	Fosfatasa ácido prostática libre (PSA)	IL-2	Lewis Sialyl X	PSA total	VEGF
Ciclina dependiente del inhibidor de quinasa 2	Fosfatasa alcalina placentaria	IL-2 receptor α	Ligando Fas	RANTES	VEGF-D
Colágeno tipo I	Fragmento de citoqueratina 21-1 (CYFRA 21-1)	IL2- receptor β	Lipoproteína de baja densidad	Receptor de estrógenos	α fetoproteína
Complemento C4	G- CSF	IL-3	MCP-1	S100	α 1 antiqumotripsina
Condroitin sulfato	GM- CSF	IL-4	MCP-2	Sialoproteína ósea	α 2 macroglobulina
Cromogranina	Gonadotropina coriónica α	IL-5	MCP-3	TAG-72	Mesotelina

Recogida y análisis de datos

Todas las muestras de LP se han analizado en una micromatriz proteínica comercializada de Whatman Serum Biomarker Chip® (Sanford, EEUU). Cada porta (*slide* o *chip*) contiene 2 *arrays* idénticos de 120 anticuerpos representados por triplicado (figura 2).

En uno de los *arrays* se incubaba el LP problema (ADC pulmonar, MPM maligno o linfoma) y en el otro el LP control (TBC), marcados con BIO-ULS (*Universal Linkage System*). Posteriormente, se eliminan las proteínas no fijadas mediante lavado y se detectan las proteínas restantes del chip con conjugados fluorescentes de estreptavidina-DY647. Un software convierte los datos de fluorescencia en valores numéricos que representan la abundancia de antígeno en el LP problema respecto al LP control.

Figura 2. Representación del mecanismo de acción de los chips de biomarcadores séricos



Para el procesamiento de muestras se prepararon los portas con los DP seleccionados. Se realizó el marcaje BIO-ULS y, posteriormente, se eliminó el BIO-ULS libre. Se procedió a la incubación de los microarrays y, por último, al lavado de proteínas no unidas y detección del marcaje. Este método se representa en la siguiente figura.

Figura 3. Método de preparación de las muestras de los biochips para su procesamiento



Sample preparation

- Collect Serum samples

Protein labeling

- 2 μ l serum
- BIO-ULS or FLU-ULS
- 100 μ l volumen
- Overnight 37°C

Free label removal

- Prepare ULS-Trap column
- Add 10 μ l x *Protblock*
- Load 110 μ l on ULS-Trap column
- Centrifuge
- Collect flow through

Incubation on antibody arrays

- Adjust volumes with 1 x *Protblock*
- Add samples on pre-blocked array slides
- Incubate 1.5 hours at room temperature while gently rocking
- Wash the slides several times with washing buffer

Probing of FLU-ULS or BIO-ULS with fluorescent conjugates

- Add detection solution: anti-Flu-DY647 or Streptavidin-DY647
- Incubate 45 min. at room temperatura in the dark while gently rocking

Diseño del experimento

Cada par de muestras independientes de MPM y ADC de pulmón, apareadas por sexo y edad, se han estudiado en relación a una muestra de TBC, apareada por sexo y –en la medida de lo posible– por edad. Igualmente, los linfomas con ADA pleural falsamente elevada se han comparado en el chip con una muestra independiente de TBC con una actividad pleural elevada de ADA. En la muestra seleccionada, todos los linfomas, 4 MPM y 2 ADCs (total n=18) de la cohorte de derivación tenían valores de ADA >35 U/L.

Procesamiento de biochips

El material se analizó en Maine Manufacturing LLC (USA). Las muestras se recibieron en dicho lugar el 19 de octubre de 2011. Los ensayos y análisis de la muestra se llevaron a cabo del 20 al 26 octubre 2011, y los resultados se reportaron el 27 de octubre 2011.

Se enviaron 70 portas marcados con fluorescencia (29 que comparaba ADC vs. MESO; 29 para comparar DPM vs. DP benigno y 12 linfomas vs. TBC). Los resultados se nos enviaron en hojas de Excel por cada pareja de muestras y se adjuntaron en un CD las imágenes de los resultados de fluorescencia de los biochips.

Métodos:

1. Los portas se fotografiaron en un escáner AXON, un dispositivo molecular de GenePix 4200A fluorescentes. Las imágenes matriz se guardaron como archivos de 16 bits TIF, con una resolución de píxel de 10 micras.
2. Las imágenes se analizaron utilizando el software ArrayVision. La intensidad se determinó en función de la señal de fondo.

Se utilizó Microsoft Excel para el análisis y representación de datos. La intensidad media máxima se utilizó como método para la normalización de los datos y se realizó otra clasificación utilizando la intensidad.

Todas las portas se digitalizaron mediante un ajuste de potencia de láser de 95% y un fotomultiplicador de 260. Una de las muestras, la 00409946 fue escaneada, además, con un tubo fotomultiplicador de 220 y 240, debido a la saturación de intensidad de los píxeles de la hemoglobina.

Análisis de datos:

Los datos extraídos de los biochips procesados fueron los siguientes:

- (1) Porcentaje de la intensidad de un gráfico de dispersión
- (2) Porcentaje de regresión de intensidad
- (3) Porcentaje de los datos de intensidad
- (4) Rango de dispersión
- (5) Cambio en el orden de datos
- (6) Análisis de ordenamiento de las proteínas
- (7) Datos crudos
- (8) Análisis de regresión
- (9) Análisis de la intensidad

Se realizó una comparación entre las diferentes muestras apareadas de controles y pruebas, utilizando 4 medidas de comparaciones entre los grupos:

- Diferencia de intensidad
- Diferencia de rango de intensidad
- Fold change de la intensidad absoluta
- Logaritmo en base 2 de la expresión de intensidad

Medición de la ADA y otros marcadores empleados en las técnicas de validación

La enzima ADA en el LP se midió mediante un método cinético comercial (Roche Diagnostics, Barcelona, España) en un analizador Modular DP.

Para la cuantificación de los antígenos CA15.3 y CA19.9 se utilizó un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA), automatizado en un analizador Elecsys Modular Analytics de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania).

Se trata de una técnica de tipo sandwich que utiliza dos anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra el antígeno de interés. Un primer anticuerpo, marcado con biotina, permite la fijación del antígeno capturado en la fase sólida (micropartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina). El segundo, marcado con un quelato de rutenio, posibilita la detección y la cuantificación del antígeno después de una reacción quimioluminiscente mediada por dicho quelato.

Según datos del fabricante, la imprecisión intraserial de ambos métodos es inferior al 5%.

La determinación de la proteína C-reactiva (PCR) se realizó mediante inmunoensayo turbidimétrico, en un autoanalizador AU 400 de Beckman Coulter (Brea, CA, USA). En la reacción, la muestra problema se enfrenta a un anticuerpo específico contra la PCR, formándose complejos antígeno-anticuerpo insolubles. La tasa de formación de los complejos es proporcional a la cantidad de PCR presente en la muestra, y puede monitorizarse midiendo la absorbancia a 340 nm.

La imprecisión intraserial del método es inferior al 5%.

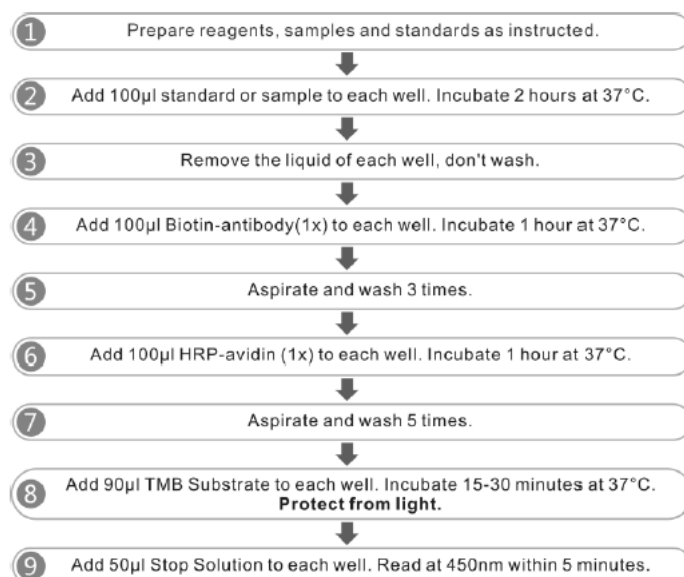
Para el resto de marcadores (catepsina B, kalikreína 12, condroitín sulfato, metaloproteinasa 9, angiostatina y metaloproteinasa 3) se emplearon métodos de enzimoimmunoensayo (ELISA) en microplaca (Cusabio Lifescience (Wuhan, R.P. de

China), automatizados en un procesador de microplacas DS-2 Dynex (Magellan Biosciencias).

En estos inmunoensayos de tipo sandwich, el primer anticuerpo (Ac) está fijado a la base del pocillo. El antígeno de interés de la muestra es inmovilizado por este Ac y, tras una fase de lavado, la unión puede revelarse añadiendo sucesivamente un segundo Ac conjugado con biotina, el complejo estreptavidina-peroxidasa y, finalmente, el substrato tetrametil benzidina. La acción de la peroxidasa sobre el substrato da lugar a un producto coloreado, medible a 450 nm. La reacción se detiene añadiendo ácido sulfúrico y se mide espectrofotométricamente el color desarrollado. El valor de absorbancia medido es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. En todas las técnicas la imprecisión intransayo es, según el fabricante, inferior al 8%. Estas pruebas tienen una elevada sensibilidad y excelente especificidad para la detección de dichas proteínas. Este es un esquema del procedimiento realizado:

Figura 4. Resumen del procedimiento para el procesamiento de las proteínas en la cohorte de validación

ASSAY PROCEDURE SUMMARY



*Samples may require dilution. Please refer to Sample Preparation section.

Los valores de detección de las distintas proteínas son los siguientes:

Tabla 9. Dosis mínima detectable por ELISA y rango de las proteínas valoradas en la cohorte de validación

Proteína	Rango (ng/ml)	Dosis mínima detectable (ng/ml)
Catepsina B	0,31-20	< 0,078
Kalicleína 12	1,56- 100	0,39
Condroitín sulfato	0,156- 10	<0,039
MMP-9	0,312- 20	<0,078
MMP-3	0,156- 10	<0,039

Análisis estadístico

Cálculo del tamaño muestral

El tamaño muestral mínimo necesario se calculó aplicando la fórmula de Jung (Bioinformatics, 2005) para contraste bilateral, asumiendo un tamaño del efecto que sea constante e igual a 1 para los 120 biomarcadores candidatos.

En la comparación de mesoteliomas con adenocarcinomas de pulmón (siendo los controles DP tuberculosos), se esperaba encontrar una expresión diferencial de aproximadamente el 10% de los biomarcadores estudiados. Con la aplicación de la fórmula de Jung (Bioinformatics, 2005), necesitábamos un mínimo de 29 muestras por grupo, si consideramos los siguientes condicionantes: 1) búsqueda de un número similar de muestras en cada grupo, 2) identificación de al menos un 80% (potencia) de los biomarcadores con expresión diferencial y 3) FDR (*false discovery rate*) del 5%; el error tipo I a partir del cual se establecen biomarcadores con expresión diferencial es del 0,0047.

Para la comparación de DPs malignos y DPs tuberculosos, también esperamos encontrar un 10% de biomarcadores con expresión diferencial. Sin embargo, al disponer de un grupo de tumores heterogéneo, sólo prevemos identificar un 60% de los biomarcadores diferenciales (comunes a linfomas, mesoteliomas y adenocarcinomas de pulmón). Fijando el mismo FDR y el mismo número de pacientes en los dos grupos, necesitaremos un mínimo de 23 muestras en cada grupo.

Se realizaron tres análisis comparativos: 1) Comparación entre expresiones proteicas de ADC de pulmón o MPM y TBC (se analizan 58 casos válidos entre ADC de pulmón y MPM, con sus correspondientes casos apareados de TBC); 2) Comparación entre expresiones proteicas de ADC de pulmón y MPM (se analizan 29 ADC de pulmón apareados con 29 MPM); y 3) Comparación entre expresiones proteicas de linfomas y

TBC con ADA > 35 U/L (se analizan 12 linfomas con 12 TBC apareados).

La expresión de cada proteína se estimó a partir de la intensidad en escala logarítmica en base 2. La expresión diferencial de cada proteína se valoró como la diferencia entre las intensidades de expresión en escala logarítmica, es decir, el logaritmo en base 2 del “Fold-Change” en la intensidad de expresión de la proteína.

El análisis descriptivo consistió en un análisis de las correlaciones (heatmaps) entre expresiones proteicas diferentes en cada una de las 3 comparaciones, seguido de un análisis apareado comparativo de la distribución de la expresión diferencial entre los grupos a comparar, utilizando la prueba no paramétrica de los rangos con signo de Wilcoxon para datos apareados. También se aplicó la corrección de Holm para comparaciones múltiples (Holm S, 1979).

Posteriormente, se realizó un análisis multivariante supervisado utilizando el método Random Forest (combinación de árboles predictores de clasificación de datos) y en base al índice de Gini, coeficiente entre 0 y 1 que mide desigualdad estadística (Gini C, 1912). Este índice nos permitió valorar la importancia de cada proteína en el análisis comparativo con el objetivo de identificar las proteínas cuyo perfil de expresión clasificarán los casos según su comportamiento en cada uno de los análisis comparativos.

Se construyeron los árboles de clasificación, los cuales mediante análisis de partición recursiva o inferencia condicional permitieron construir un árbol de decisión para clasificar correctamente los casos, optimizando la sensibilidad y la especificidad.

Para determinar el tamaño muestral de la validación, se seleccionaron 5 pacientes por cada proteína escogida para formar parte del perfil diferencial. Dada la baja incidencia de DP secundario a linfomas, se recogió el máximo número posible de casos para comprobar el perfil proteico identificado en el estudio inicial.

Al valorar la expresión en la muestra de validación, se aplicó una técnica diferente, que obligó a reestablecer los puntos de corte de las proteínas identificadas en los árboles de clasificación. Para ello se construyó un modelo de regresión logística. Las proteínas se seleccionaron con el fin de maximizar la capacidad del modelo para discriminar, o lo que es lo mismo, maximizar la curva ROC.

Finalmente, el modelo se simplificó en una suma de puntuaciones en función de la magnitud de los coeficientes del modelo, es decir, de la importancia de la expresión de la proteína para discriminar entre los grupos a identificar por el modelo.

Resultados

Demografía de los pacientes seleccionados para el estudio mediante microchips

En el análisis de los datos se incluyó un total de 105 pacientes en la cohorte de derivación y 102 pacientes en la cohorte de validación. En la tabla 10 se resumen las características demográficas de estos pacientes.

Tabla 10. Características demográficas de la población

	Cohorte derivación (n=105)	Cohorte validación (n=102)	Valor p*
Mesotelioma			
N	29	20	
Edad (años)	72 (64-77)	69,5 (61,5-75,5)	0,35
Sexo masculino (%)	24 (82,8)	15 (75,0)	0,72
Proteínas LP (g/dL)	4,4 (3,8-5)	4,2 (3,7-4,6)	0,41
ADA (U/L)	25,7 (15,6-30)	22,3 (16,8-27,8)	0,91
ADA >35 (%)	4/19 (21,1)	1/8 (12,5)	1
Histología MPM			
Epitelial	12	14	
Sarcomatoide	6	4	
Mixto	3	2	
Desconocido	8	0	
Adenocarcinoma			
N	29	30	
Edad (años)	72 (64-76)	72,5 (60,3-80,8)	0,53
Sexo masculino (%)	24 (82,8)	19 (63,3)	0,14
Proteínas LP (g/dL)	4,5 (4,2-5,2)	4,4 (3,7-4,8)	0,24
ADA (U/L)	23,3 (18,1-27,3)	18,3 (14,9-21,5)	0,0104
ADA >35 (%)	2/29 (6,9)	0/30 (0)	0,24
Linfoma			
N	12	18	
Edad (años)	58 (45,5-73,7)	72 (60,5-79,8)	0,25
Sexo masculino (%)	8 (67)	8 (44)	0,28
Proteínas LP (g/dL)	4,4 (3,9-4,5)	3,6 (3,3-4,5)	0,18
ADA (U/L)	71,4 (43,5-159)	27,5 (17,4-36,5)	<0,001
ADA >35 (%)	12/12 (100)	5/18 (27,8)	<0,001
Tuberculosis			
N	35	34	
Edad (años)	44,0 (38,5-53,5)	31 (26,3-38,8)	<0,001
Sexo masculino (%)	26 (74,3)	22 (64,7)	0,44
Proteínas LP (g/dL)	5,3 (4,8-5,7)	5,3 (4,8-5,7)	0,95
ADA (U/L)	67,6 (60,2-82,7)	61,5 (52,6-75,3)	0,09
ADA >35 (%)	35/35 (100)	33/34 (97,1)	0,49
Los datos se presentan como Mediana (cuartil25-cuartil75) ADA: Adenosina desaminasa; MPM: Mesotelioma pleural maligno Cohorte derivación: 4 tuberculosis probables; cohorte validación: 16 tuberculosis probables * Valor p: Test de Fisher y Mann-Whitney para variables cualitativas y cuantitativas, respectivamente. Significativo < 0,05			

La mediana de edad de los pacientes con tuberculosis fue significativamente inferior comparada con el resto de grupos y entre sí. Este dato, aunque a priori se podría pensar que puede conllevar a sesgos en el estudio consideramos que corresponde a la presentación habitual en la práctica clínica de las diferentes patologías en los diferentes grupos de edad. La mediana en la cohorte de derivación en los pacientes con TBC fue de 44 años (38,5- 53,5) y de 31 años (26,3- 38,8) en la de validación ($p < 0,001$).

Las otras diferencias estadísticamente significativas entre ambas cohortes fueron la ADA en el grupo de los linfomas, con una mediana de 71,4 U/L y el 100% de los pacientes con ADA > 35 U/L en la cohorte de derivación vs. 27,5 U/L y 27,8% respectivamente en la de validación ($< 0,001$).

En el grupo de los ADCs hubo diferencias estadísticamente significativas en la mediana de la ADA en ambas cohortes: 23,3 U/L vs. 18,3 U/L ($p = 0,0104$).

Con respecto al resto de variables no había diferencias significativas ni en el grupo de los MPM.

Descripción del perfil proteómico de las muestras

Se realizaron tres análisis comparativos:

- A) Comparación entre expresiones proteicas de DP malignos (ADC de pulmón o MPM) y TBC (se analizaron 58 casos válidos entre ADC de pulmón y MPM con sus correspondientes casos apareados de TBC).
- B) Comparación entre expresiones proteicas de ADC de pulmón y MPM (se analizan 29 ADCs de pulmón apareados con 29 MPMs).
- C) Comparación entre expresiones proteicas de linfomas y TBC con ADA > 35 U/L (se analizan 12 linfomas apareados con 12 TBC).

Se utilizaron varios métodos diferentes de análisis utilizando la intensidad media máxima para normalizar los datos y analizando el rango de la intensidad de la señal. Las proteínas diferenciales en dicho análisis se muestran en las tablas que presentamos a continuación.

Comparación entre DPM (ADC o MPM) y DP benignos (TBC)

Se realizó un análisis bivariante para valorar las proteínas con diferencias significativas en su intensidad de expresión entre los DPM y DP benignos. Los resultados se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Resultados de las proteínas con diferencias significativas en su expresión entre los DPM y DP benignos en función de las medidas comparativas utilizadas

Diferencia de intensidad	Diferencia de rango de intensidad	Fold change	Log2 de la expresión de intensidad
MMP-9 Transferrina Albúmina sérica Interferón gamma Catepsina B TGF- α VCAM-1 HCG	Apolipoproteína Catepsina B Transferrina Albúmina sérica MMP-9 CA12.5 PCR	MMP-9 Transferrina Catepsina B Albúmina sérica HCG Apolipoproteína	MMP-9 Transferrina PCR Catepsina B Albúmina sérica TGF- α VCAM-1

La expresión de las proteínas MMP-9, PCR, catepsina B y ferritina fue menor en las muestras tumorales que en los casos con tuberculosis, mientras que la expresión de las proteínas sialoproteína ósea, apolipoproteína, albúmina sérica, transferrina, hemoglobina, α HCG y haptoglobulina fueron mayores en las muestras tumorales que en los casos con TBC.

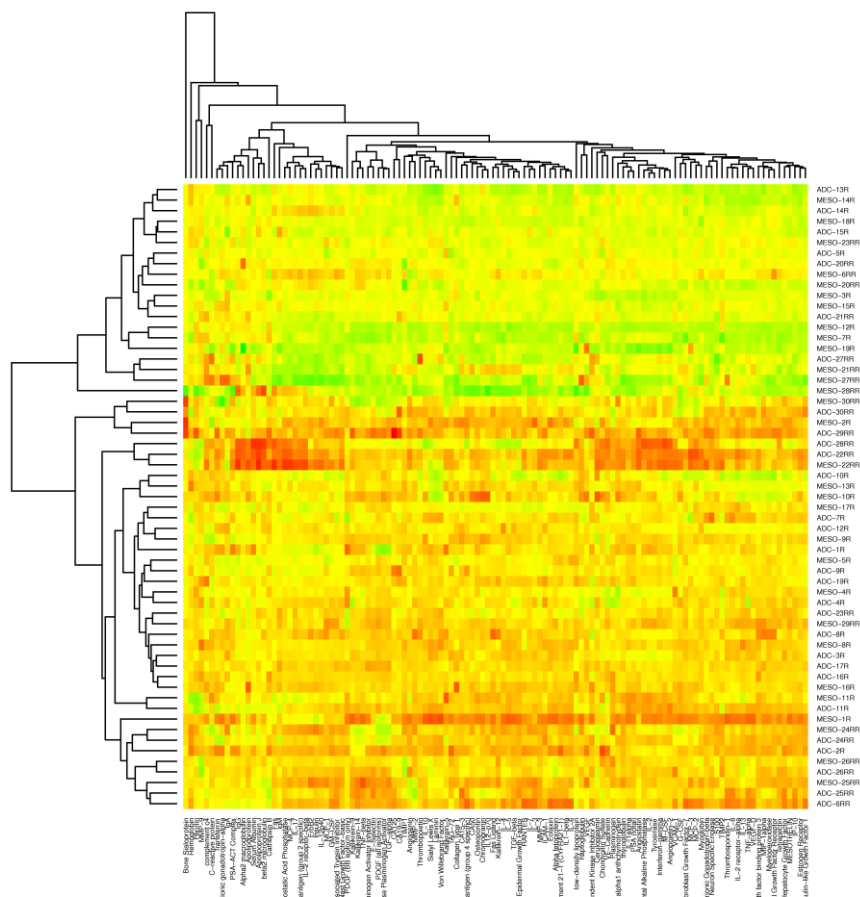
En el análisis por comparaciones múltiples, las proteínas que resultaron significativas independientemente del método utilizado fueron la MMP-9, albúmina sérica, transferrina, catepsina B, la HCG, la PCR y la apolipoproteína.

En el análisis descriptivo de las proteínas, consistente en valorar las correlaciones entre expresiones proteicas diferentes entre ambos grupos, obtuvimos los resultados presentados en los siguientes mapas de calor (heatmaps). Los colores van de rojo a verde, en función de las proteínas expresadas en las diferentes muestras. Cuanta mayor intensidad en el tumor con respecto a los tuberculosos será rojo; mientras que

cuando sea a la inversa, se teñirá de color verde. Entre ambos extremos, existe una graduación de colores.

Se realizó la agrupación (clúster) de las proteínas en función de la expresión proteica en el tumor. Cada grupo de proteínas, unido por las líneas que se encuentran en la parte superior e izquierda, representa un grupo con características similares entre sí (agrupaciones), más semejantes cuanto más próximas se encuentran. Esta figura representa el grado de similitud o diferencias de las proteínas. No existe un perfil proteómico claro que diferencie a las distintas entidades del DP ya que, si nos fijamos en la columna de la parte derecha, los ADC y MPM se alternan.

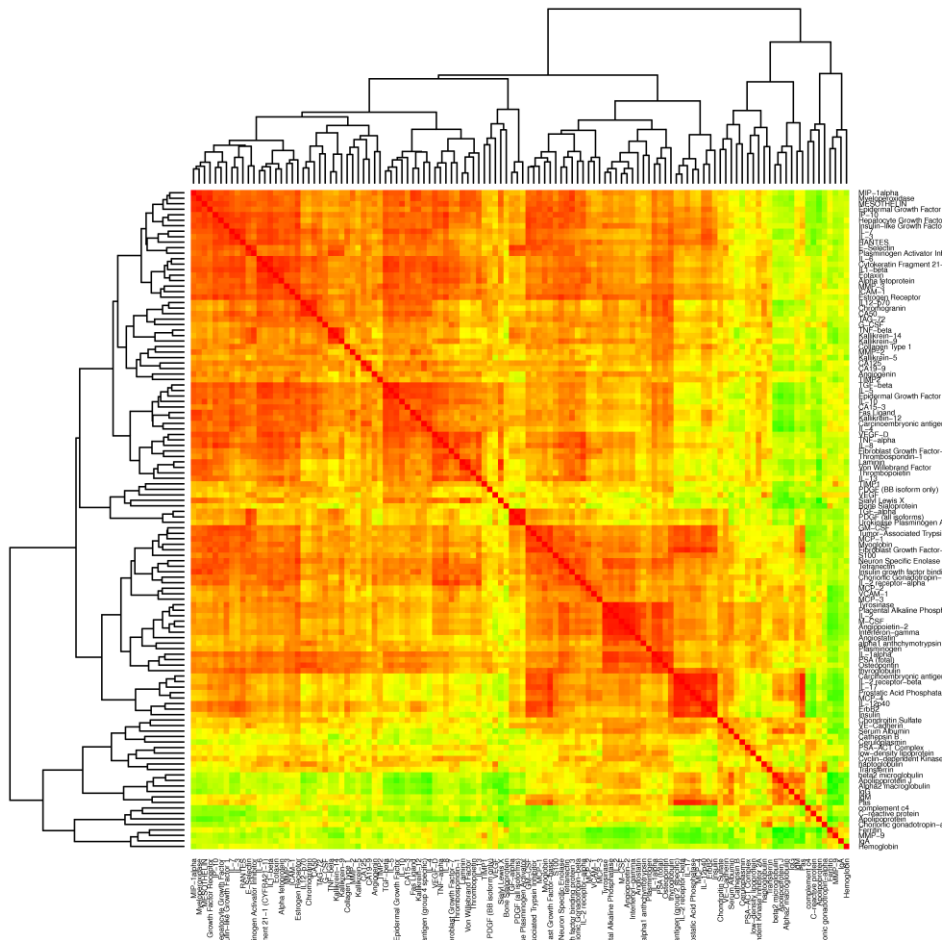
Figura 5. Heatmap de intensidad relativa de expresión proteica para las muestras de DP de pacientes diagnosticados de DPM (MPM y ADC) vs. TBC. Análisis de proximidad de expresión relativa entre muestras y proteínas



En la figura 6, se representan las interrelaciones de las proteínas entre sí en función del valor del logaritmo en base 2 y basado en la intensidad relativa de su representación en el DP maligno o tuberculoso.

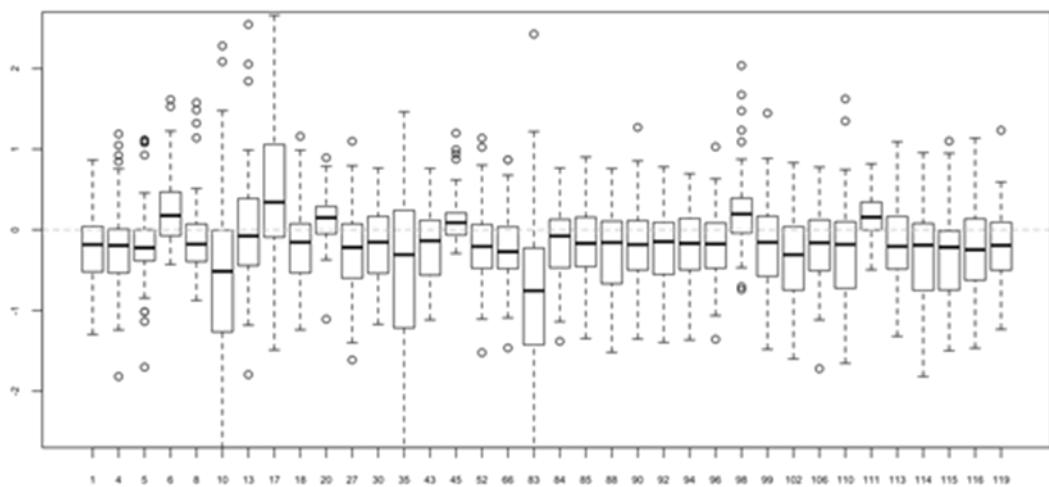
Los colores van de rojo a verde en función de la correlación que exista entre ellas. Si la correlación =1 (correlación perfecta), se identificaría con el color rojo; si la correlación es inversa (correlación=-1, máxima correlación negativa), se identificaría con el color verde. El amarillo significa ausencia de correlación lineal. Por tanto, las proteínas se han ordenado y agrupado en función a la correlación existente entre los valores relativos de intensidad de los DP malignos (MPM y ADC) y benignos (TBC). La sialoproteína ósea es la única que no forma ningún clúster.

Figura 6. Heatmap resultante de la correlación lineal de la expresión proteica entre DPM vs. TBC (Log2(Intensity M or LC/Intensity TBC))



Analizamos el distinto comportamiento de las proteínas en ambos grupos y lo representamos mediante diagramas de caja. Cuanto más se alejen los diagramas de caja de cada proteína del 0 (línea discontinua horizontal), mayor es la expresión diferencial entre ambas entidades (figura 7).

Figura 7. Diagrama de cajas que representa la expresión diferencial ajustada de proteínas entre derrame pleural maligno y tuberculoso



Las proteínas diferenciales representadas en la figura aparecen en el listado siguiente.

Tabla 12. Listado de proteínas diferenciales entre derrames pleurales malignos y benignos

ID	Proteína	ID	Proteína	ID	Proteína
1	α fetoproteína	27	CYFRA21.1	88	PDGF (todas isoformas)
4	Angiogenina	30	EGFR	99	Albúmina sérica
5	Angiopoyetina-2	35	Fas Ligando	102	Tetranectina
6	Angiostatina	43	Factor crecimiento hepatocitario	106	Trombospondina-1
8	Apolipoproteína J	45	IgA	110	TNF-α
10	Sialoproteína ósea	52	IL-17	111	TNF-β
13	CA19-9	66	IGF-1	113	Proteína asociada Inhibidor tripsina
17	Catepsina B	83	MMP-9	114	Tirosinasa
18	Ceruloplasmina	84	Mieloperoxidasa	115	uPA
20	Gonadotropina coriónica-α	85	Mioglobina	116	VCAM-1
				119	VEGF-D

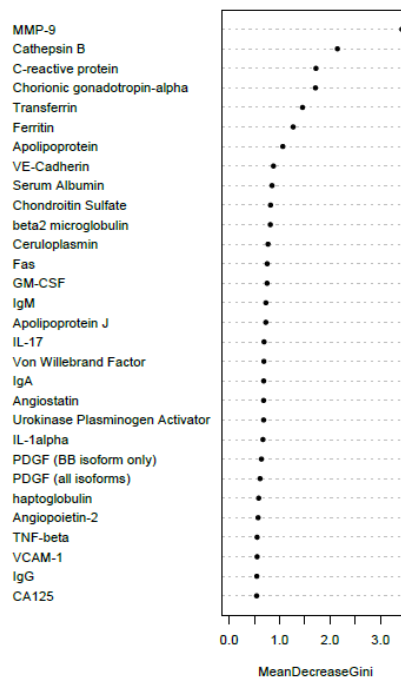
Posteriormente, se realizó un análisis bivalente comparativo de la distribución de la expresión diferencial entre los 2 grupos a comparar utilizando la prueba de rangos con signo de Wilcoxon de dos muestras apareadas. Los resultados comparativos entre las expresiones proteicas del grupo de DPM y DP benignos se expresan en la tabla 13:

Tabla 13. Intervalo de confianza y valor p de las proteínas significativas en el análisis bivalente entre los derrames pleurales malignos y benignos

Proteína	IC 95%	Valor p ajustado
MMP-9	[-1,260, -0,567]	<,0001
Catepsina B	[0,204, 0,655]	0,0060
PCR	[-0,916,-0,288]	0,0060
TGF- α	[-0,484,-0,156]	0,0060
VCAM-1	[-0,446,-0,134]	0,0069
Ferritina	[-0,772,-0,134]	0,0245
IFN-gamma	[-0,330,-0,115]	0,0081
uPA	[-0,448,-0,109]	0,0095
α 1 antiqumotripsina	[-0,364,-0,105]	0,0097
E-Selectina	[-0,408,-0,104]	0,0097
PDGF (todas isoformas)	[-0,418,-0,099]	0,0128
Angiostatina	[0,295,-0,096]	0,0085
Transferrina	[0,095, 0,236]	0,0009
Angiopoyetina-2	[-0,332,-0,095]	0,0097
Apolipoproteína	[0,094, 0,326]	0,0085
Albúmina sérica	[0,091, 0,294]	0,0060
Factor VW	[-0,333,-0,089]	0,0128
TNF- β	[-0,431,-0,082]	0,0201
VE-Cadherina	[-0,410,-0,087]	0,0201
Ceruloplasmina	[-0,326,-0,064]	0,0186
EGF	[-0,330,-0,060]	0,0201
Tiroglobulina	[-0,315,-0,061]	0,0213
F. Activ. Plasminógeno	[-0,333,-0,061]	0,0186
A Gonadotropina Coriónica	[0,060, 0,199]	0,0085
β 2 microglobulina	[-0,256,-0,058]	0,0260
IL-2	[-0,309,-0,057]	0,0331
PSA (total)	[-0,293,-0,053]	0,0243
Tirosinasa	[-0,314,-0,053]	0,0336
F. Alc. placentar	[-0,311,-0,053]	0,0348
RANTES	[-0,291,-0,051]	0,0331
ICAM-1	[-0,297,-0,046]	0,0361
Mieloperoxidasa	[-0,305,-0,043]	0,0289
Sialyl Lewix X	[-0,337,-0,041]	0,0467
Mioglobina	[-0,264,-0,030]	0,0484
IgG	[0,028, 0,149]	0,0225

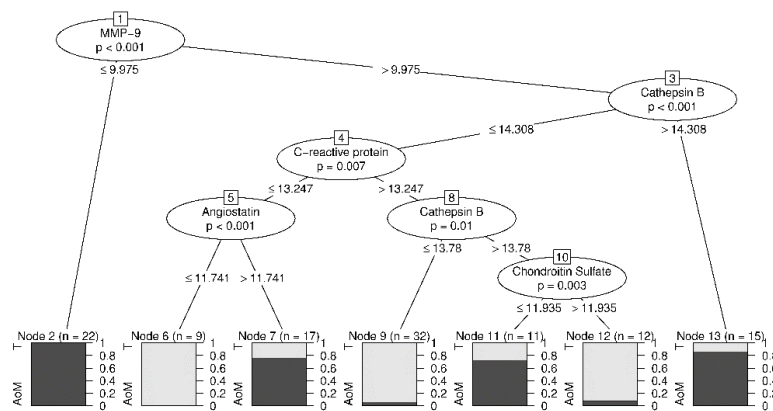
En el análisis multivariante supervisado, las 6 primeras proteínas que diferenciaron mejor los DP benignos de malignos corresponden a la MMP-9, catepsina B, PCR, α - gonadotropina coriónica, ferritina y transferrina. Se confirma la importancia de algunas de las proteínas identificadas en el análisis bivariante.

Figura 8. Análisis multivariante supervisado de la expresión diferencial de la intensidad de las proteínas en escala logarítmica en base 2 para la comparación entre derrame pleural maligno y tuberculoso



Partiendo de estos últimos datos, buscamos un algoritmo diagnóstico mediante un análisis univariado. El árbol de clasificación óptimo, realizado por inferencia condicional, que incluyó cinco proteínas (MMP-9, catepsina B, PCR, angiostatina y CS), permitió diferenciar ambas entidades pleurales. Optimizando los puntos de corte, se define el árbol representado en la siguiente figura:

Figura 9. Árbol de clasificación condicional de las proteínas diferenciales entre derrame pleural maligno y tuberculoso



Si se cumple la condición de que el valor de luminiscencia de MMP-9 $\leq 9,975$ se desciende por la izquierda (T de TBC). Si no se cumple, se sigue por la derecha y se valora la siguiente condición. El árbol de clasificación intenta diferenciar los casos de DP malignos (ADC y MPM) de los DP benignos (TBC), definiendo así sensibilidad para identificar a los malignos y especificidad para clasificar bien a los no malignos (tuberculosos). Con este árbol se alcanza una sensibilidad para distinguir DPM de TBC del 94,9%, con un IC 95%= (85,9%, 98,9%) y una especificidad del 84,7% con un IC95%= (73%, 92,8%).

Comparación entre ADC y MPM

En el análisis bivalente realizado para valorar las proteínas con diferencias significativas en su intensidad de expresión entre los ADC y MPM se muestran en las tabla 14.

Tabla 14. Resultados de las proteínas con diferencias significativas en su expresión entre los ADC y MPM en función de las medidas comparativas utilizadas

Diferencia de intensidad	Diferencia de rango de intensidad	Fold change	Log2 de la expresión de intensidad
α-2 Macroglobulina PCR Hemoglobina LDL	CA125 Ca19.9 Kalicreína 14	Sialoproteína ósea	PCR CA19.9

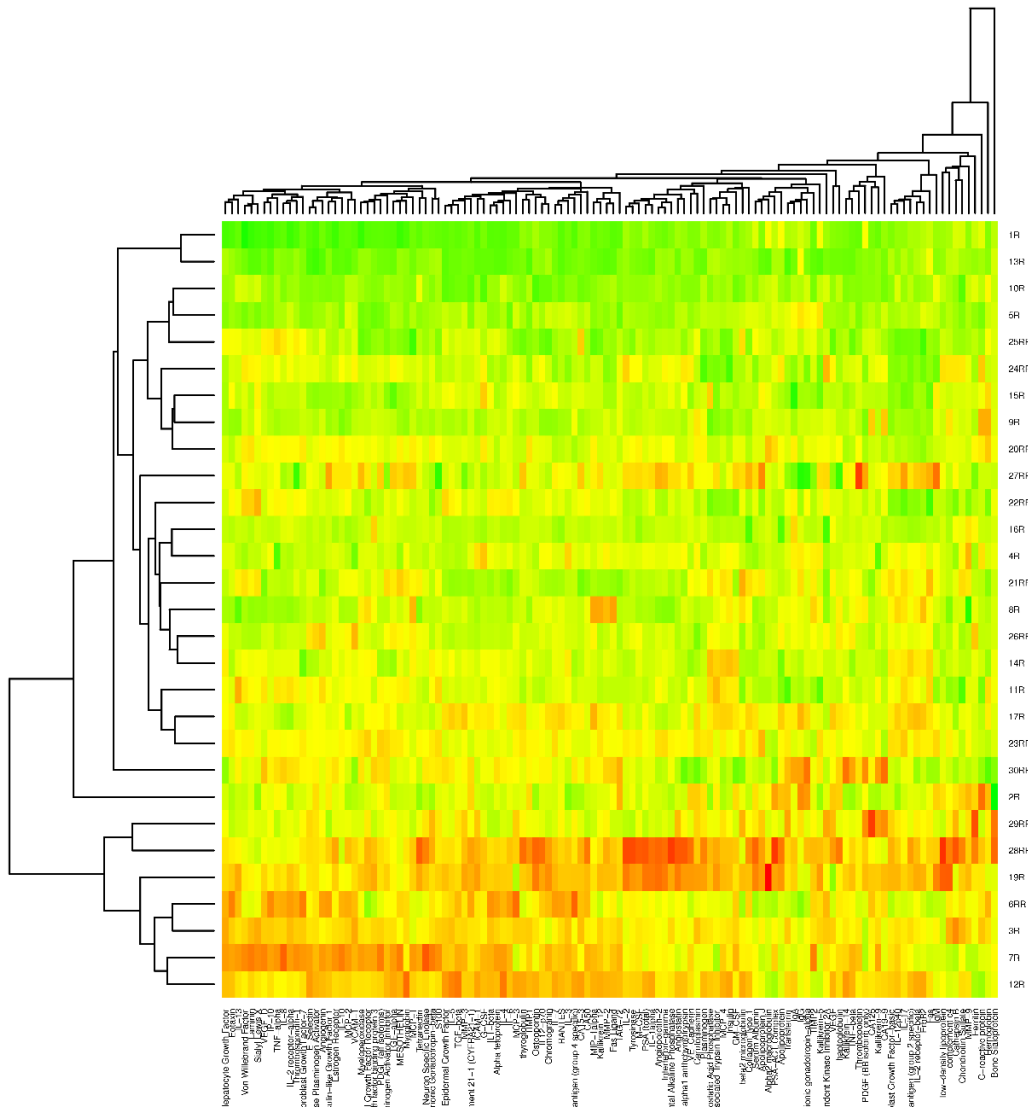
La expresión de la PCR y el CA19.9 fue mayor en los ADC que en los MPM.

Ninguna de las proteínas, resulta significativa por los 4 métodos y ninguna tiene significación estadística cuando se aplica el análisis por comparaciones múltiples.

En el análisis descriptivo que valoró las correlaciones de la expresión proteica entre los pacientes diagnosticados de ADC y MPM los colores van desde el rojo si la intensidad de la proteína en la muestra de ADC es superior a la muestra de MPM o verde si es a la inversa.

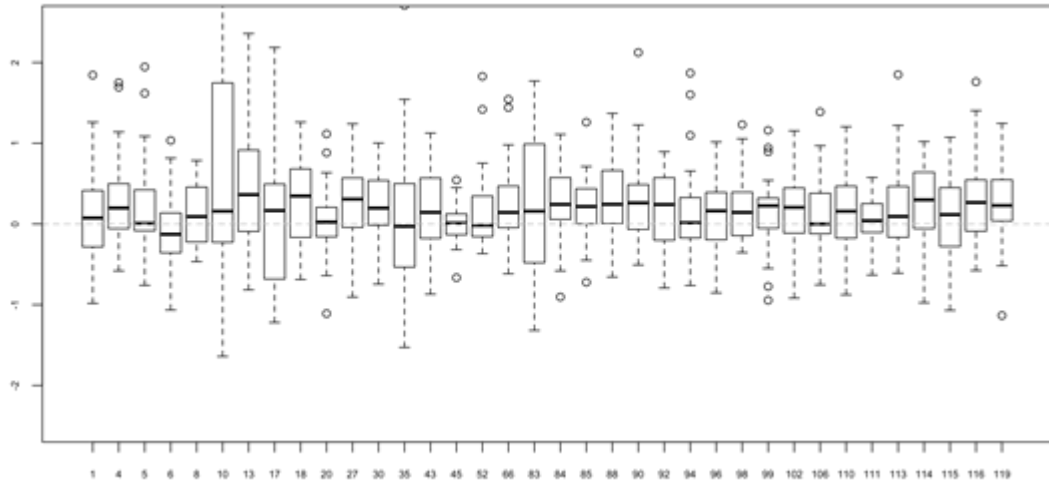
En el análisis por clústeres, sólo hay una proteína cuyo perfil de expresión relativo entre ADC y MPM está muy lejos del resto de proteínas: la sialoproteína ósea.

Figura 10. Heatmap de intensidad relativa de expresión proteica para las muestras de DP de pacientes diagnosticados de ADC vs. MPM. Análisis de proximidad de expresión relativa entre muestras y proteínas



La siguiente figura representa las interrelaciones de las proteínas entre sí en función del valor del logaritmo en base 2 y basado en la intensidad relativa de su representación en el DP de ADC vs. DP de MPM.

Figura 12. Diagrama de cajas que representa la expresión diferencial ajustada de proteínas entre derrame pleural secundario a ADC vs. MPM



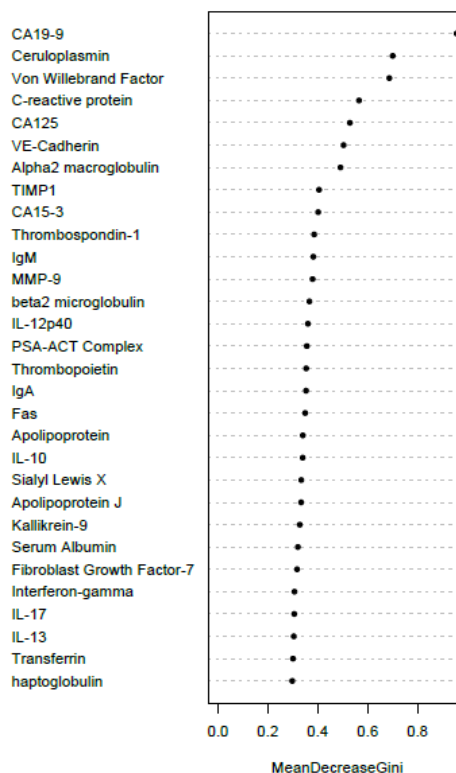
En el análisis bivalente comparativo de la distribución de la expresión diferencial entre los 2 grupos utilizando la prueba de rangos con signo de Wilcoxon de dos muestras apareadas los resultados comparativos entre las expresiones proteicas del grupo de DPM y DP benignos se expresan en la tabla 15:

Tabla 15. Intervalo de confianza y valor p de las proteínas significativas en el análisis bivalente entre adenocarcinoma y mesotelioma pleural maligno

Proteína	IC 95%	Valor p ajustado
CA19.9	[0,185, 0,824]	0.0718
Tetranectina	[0,119, 0,466]	0.0718
Trombopoyetina	[0,101,0,433]	0.0718
FGF	[0,097,0,458]	0.0718
Mieloperoxidasa	[0,090,0,427]	0.0718
FvW	[0,088,0,403]	0.0718
PDGF (todas isoformas)	[0,076,0,444]	0.0833
IGF	[0,072,0,376]	0.0718
PSA	[0,072,0,457]	0.0874
α2 Macroglobulina	[0,036,0,142]	0.0718

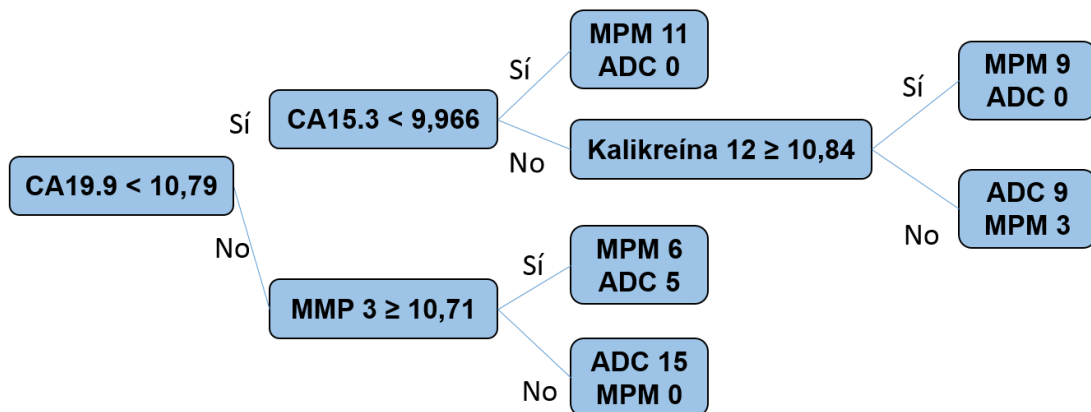
En el análisis supervisado, las diferencias de expresión de intensidades entre ADC y MPM se minimizaron y existieron algunas proteínas como el CA19.9, ceruloplasmina y el factor Von Willebrand que destacaron.

Figura 13. Análisis multivariante supervisado de la expresión diferencial de la intensidad de las proteínas en escala logarítmica en base 2 para la comparación entre adenocarcinoma y mesotelioma pleural maligno



El resultado del árbol de clasificación óptimo para diferenciar el ADC del MPM incluyó la expresión de 4 proteínas (CA19.9, kalikreína 12, CA15.3 y MMP-3). El valor de punto de corte obtenido para el CA19.9 fue de 10,79. Si los valores en LP son inferiores, se debería analizar el CA15.3. Si el valor de luminiscencia del CA15.3 es < 9,966, todos son MPM. Si son mayores del valor mencionado, deberemos analizar la kalikreína 12. Por encima de 10,84, todos los DP son MPM. Si el valor del CA19.9 es > a 10.79 deberíamos analizar la proteína MMP-3. Un valor <10,71 nos da un diagnóstico bastante certero de ADC, como podemos observar en el siguiente árbol de clasificación.

Figura 14. Árbol de clasificación entre ADC y MPM



El mejor modelo definido para diferenciar los DP de ADC vs. MPM, tendría una sensibilidad del 82,8% con un IC95%= (64,2%, 94,2%) y una especificidad del 89,7%, con un IC95%= (72,6% al 97,8%). Sin MMP-3 el árbol consigue una sensibilidad del 100% con un IC95%= (88,1%, 100%) y una especificidad del 69% con un IC95%= (49,2%, 84,7%).

Comparación entre linfomas y TBC.

En el análisis bivalente realizado para valorar las proteínas con diferencias significativas en su intensidad de expresión entre DP secundario a linfoma o TBC se observaron diferencias en la expresión de las proteínas catepsina B y VCAM-1 por dos métodos diferentes (tabla 16). Sin embargo, ninguna proteína se mantuvo como diferencialmente expresada al ajustar por comparaciones múltiples.

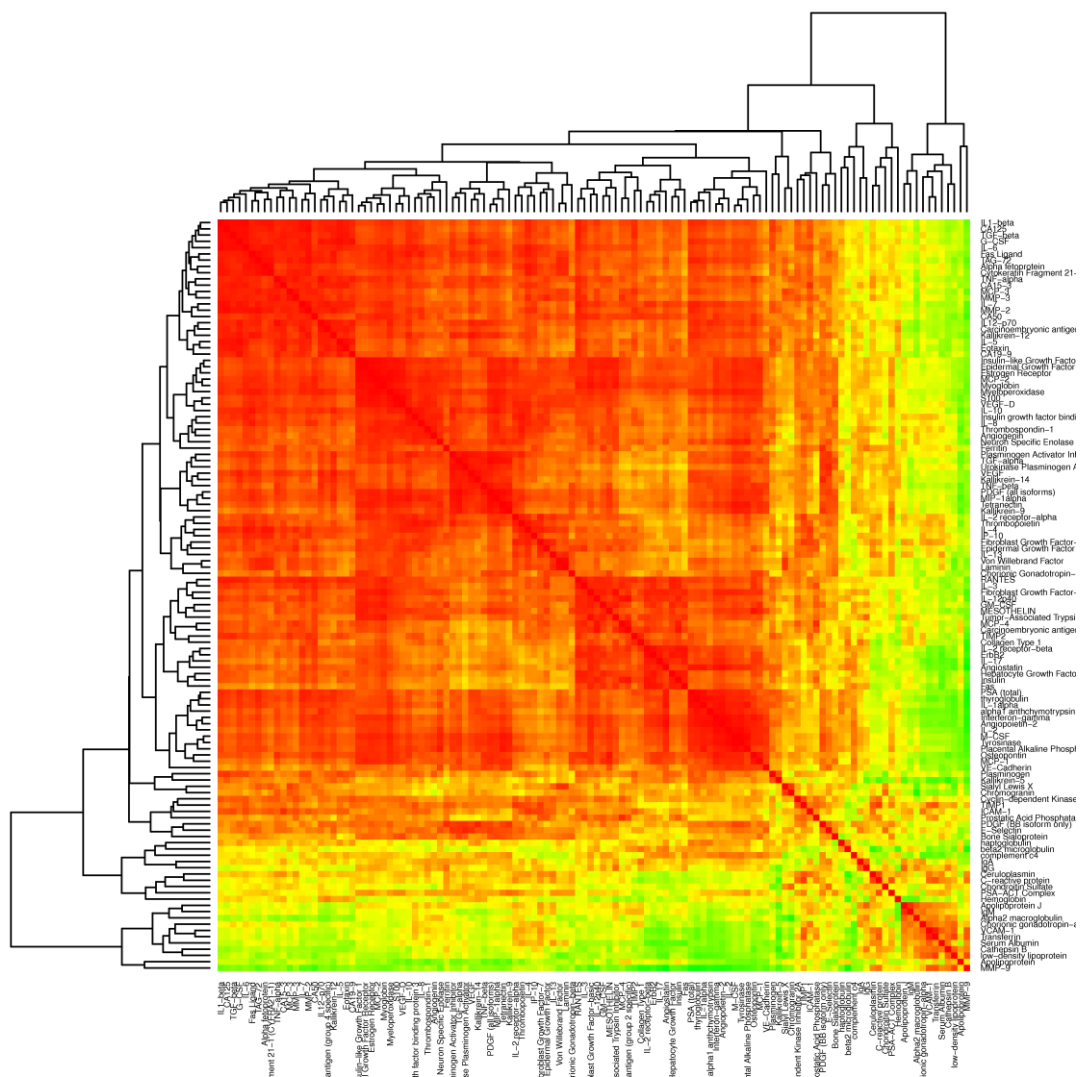
Tabla 16. Resultados de las proteínas con diferencias significativas en su expresión entre los linfomas y tuberculosos en función de las medidas comparativas utilizadas

Diferencia de intensidad	Diferencia de rango de intensidad	Fold change	Log2 de la expresión de intensidad
α-2 Macroglobulina PCR Catepsina B Hemoglobina LDL PSA-ACT Albúmina sérica	Cromogranina Complemento C4 IL-3 MMP-9 TGF- α TNF-β VCAM-1	Sialoproteína ósea	Sialoproteína ósea Catepsina B Complemento C4 Hemoglobina VCAM-1

La expresión de la proteína complemento C4 fue menor en los linfomas que en los casos de TBC, mientras que la expresión de las proteínas sialoproteína, catepsina B, hemoglobina y VCAM-1 fue mayor en los linfomas que en los casos de TBC.

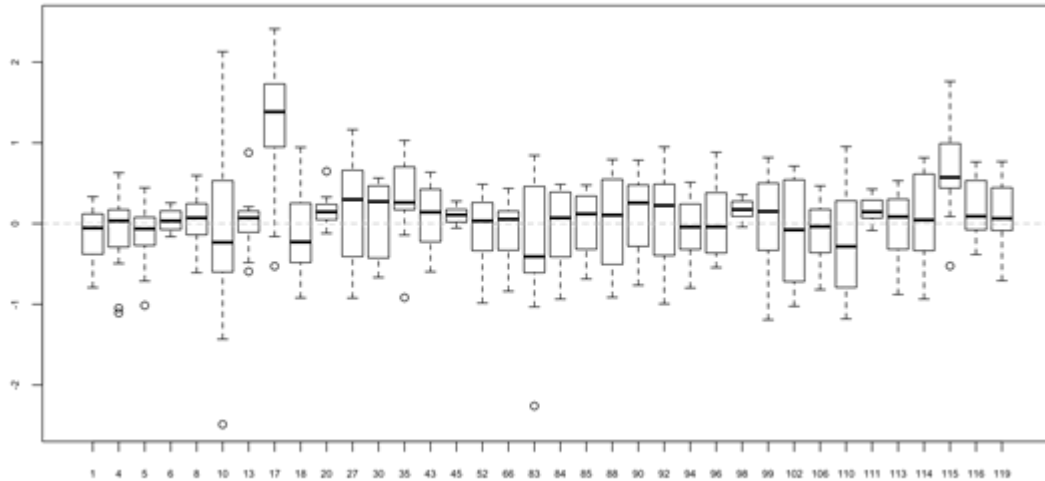
El mapa de calor representado a continuación, muestra las interrelaciones de las proteínas entre sí en función del valor del logaritmo en base 2 y basado en la intensidad relativa de las proteínas en el DP de los linfomas y DP tuberculosos. Las proteínas se ordenaron y agruparon según la correlación existente entre los valores relativos de intensidad de los linfomas y de los tuberculosos.

Figura 16. Correlación lineal de la expresión de proteínas entre derrame pleural secundario a linfomas y tuberculosis (Log2(Intensidad Linfoma/Intensidad TBC))



La diferente expresión obtenida entre las proteínas de los DP de linfomas y TBC se observan representó en un diagrama de cajas (figura 17). La proteína 17 (catepsina B) fue la que presentó mayor diferencia de todas entre ambas entidades de DP.

Figura 17. Proteínas con expresión diferencial ajustada entre linfoma vs. TBC



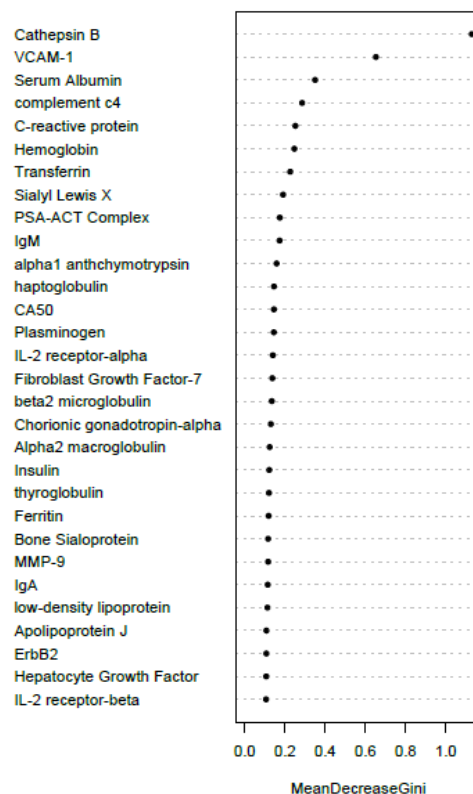
En la tabla 17 aparecen las proteínas que obtuvieron mayor expresión diferencial en el análisis bivalente comparativo mediante el test de Wilcoxon entre los subgrupos de linfomas y TBC. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos subgrupos.

Tabla 17. Intervalo de confianza y valor p de las proteínas significativas en el análisis bivalente entre linfoma y TBC

Proteína	IC 95%	Valor p ajustado
Catepsina B	[0,591, 1,745]	0.1367
VCAM-1	[0,327, 1,125]	0.1367
Trasferrina	[0,069,0,270]	0.1367
Albúmina sérica	[0,066,0,266]	0.1367
PSA	[0,056,0,261]	0.1367
IgG	[0,033,0,181]	0.1367

Se realizó un análisis multivariante supervisado que demuestra que la proteína que mejor permitió separar ambas entidades de DP fue la catepsina B, seguida de la VCAM1.

Figura 18. Análisis multivariante supervisado de la expresión diferencial de la intensidad de las proteínas en escala logarítmica en base 2 para la comparación entre linfoma y tuberculosis

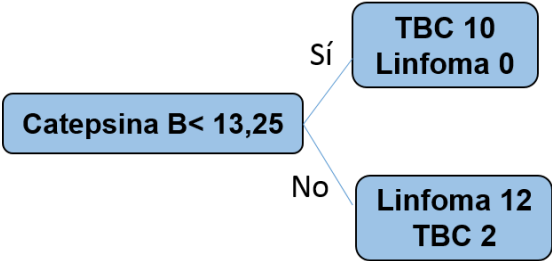


Por último, construimos árboles de clasificación los que, mediante análisis de partición recursiva o inferencia condicional, permiten construir un árbol de decisión para clasificar correctamente los casos optimizando la sensibilidad y especificidad.

En análisis comparativo de la tuberculosis con ADA alta vs. linfoma con ADA alta, apareció un solo biomarcador, capaz de diferenciarlos. El mejor árbol de clasificación incluyó exclusivamente la catepsina B. Con valores de luminiscencia $\geq 13,217$ la

catepsina B apareció como indicador de linfomas, con una sensibilidad del 100% e IC95%= (73,5%, 100%) y una especificidad del 83,3% e IC95%= (51,6%, 97,9%).

Figura 19. Árbol de clasificación de las proteínas diferenciales entre linfomas y tuberculosis



RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN

En el estudio de validación se seleccionó una nueva cohorte de pacientes de la misma base de datos. Formaron parte del estudio de 30 ADC, 20 MPM, 34 TBC y 18 linfomas.

Comparación DPM vs. benigno

Los perfiles proteómicos se validaron en una muestra de 40 pacientes, 13 de ellos (5L+ 8TBC) comunes al estudio de validación para linfoma vs. TBC. Dispusimos de 20 muestras malignas (10 ADC, 5 MPM y 5 linfomas) y 20 TBC.

Las proteínas seleccionadas para el estudio fueron la PCR, catepsina B, CS, MMP-9 y angiostatina por ser las proteínas que resultaron diferenciales entre ambos grupos en el análisis anterior. Los valores de las mismas se expresan en la tabla 18.

Tabla 18. Análisis comparativo de las proteínas seleccionadas en el grupo de validación entre DPM y DP benigno

	Condroitin sulfato (ng/ml)		Ln Condroitin sulfato (ng/ml)		MMP-9 (ng/ml)		Ln MMP-9 (ng/ml)		PCR (mg/L)		Angiostatina (mg/L)		Catepsina B (ng/ml)	
	Benigno	Maligno	Benigno	Maligno	Benigno	Maligno	Benigno	Maligno	Benigno	Maligno	Benigno	Maligno	Benigno	Maligno
N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Media	5,64	1,54	0,42	0,38	236,73	22,45	3,42	2,72	48,74	23,75	10,81	9,18	0,51	0,22
D.E.	19,53	0,58	0,99	0,32	792,24	30,29	1,53	0,74	31,56	30,62	5,25	5,30	0,53	0,14
Mínimo	0,70	1,00	-0,36	0,00	7,10	6,70	1,96	1,90	4,70	1,90	0,71	0,90	0,07	0,08
P25	1,10	1,20	0,10	0,18	15,65	10,25	2,74	2,33	23,30	4,73	8,02	6,07	0,14	0,13
P50	1,20	1,30	0,18	0,26	19,00	12,70	2,94	2,54	46,40	8,75	10,63	8,62	0,40	0,16
P75	1,45	1,90	0,37	0,64	32,75	16,62	3,45	2,80	78,10	30,05	13,34	12,09	0,53	0,29
Máximo	88,60	3,40	4,48	1,22	3533,10	129,00	8,17	4,86	100,00	109,20	23,58	21,49	1,97	0,65
Valor p	0,2204		0,2204		0,0658		0,0658		0,004267		0,2648		0,05141	

Para evaluar el valor de cada proteína en esta cohorte, realizamos un árbol de clasificación en grupos homogéneos. El sistema de puntuación que obtuvimos incluyó cuatro marcadores, que nos permitieron construir el siguiente sistema de puntuación:

SCORE=1*(PCR<12,5 mg/L)+2*(CatepsinaB<0,42 ng/ml)+ 3*(Condroitin>1,25 ng/ml)+
3* (MMP9<15,5 ng/ml).

La puntuación resultante puede ir de 0 a 9.

Con un Score > 5, la sensibilidad para diagnosticar DPM sería del 95%, con IC95%= (75,1%, 99,9%) y la especificidad del 100%, con IC95%= (83,2%, 100,0%). El AUC es 0,98 (IC 0,95-1).

Comparación de adenocarcinoma de pulmón vs. mesotelioma

Los perfiles proteómicos se validaron en una muestra de 40 pacientes, 20 ADC de pulmón y 20 MPM.

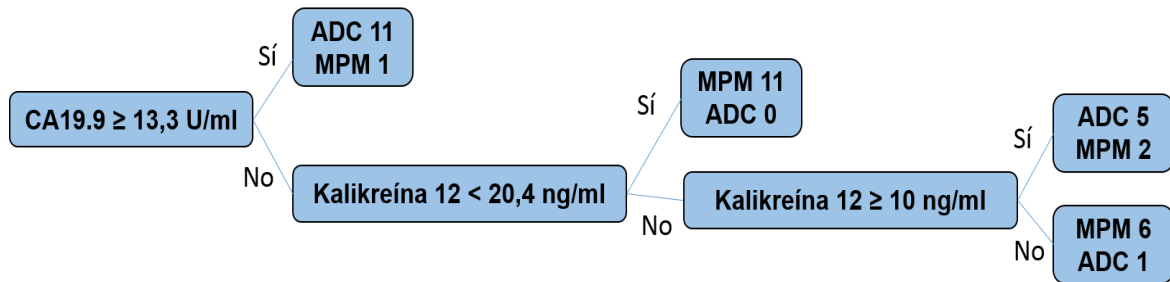
Las proteínas seleccionadas para el estudio fueron el CA15.3, CA19.9, kalikreína 12 y la MMP-3, por ser las proteínas que resultaron diferenciales entre ambos grupos en el análisis anterior. El valor de las mismas se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 19. Análisis comparativo de las proteínas seleccionadas en el grupo de validación entre ADC y MPM

	CA15.3 (U/ml)		CA19.9(U/ml)		Kalikreina 12 (ng/ml)		MMP-3 (ng/ml)	
	ADC	MPM	ADC	MPM	ADC	MPM	ADC	MPM
N	20	20	20	20	20	20	20	20
Media	330,22	51,88	367,33	7,95	22,62	44,09	0,17	0,13
D.E.	689,50	64,32	767,77	21,52	30,17	37,38	0,19	0,06
Mínimo	5,60	1,00	0,60	0,60	0,20	0,50	0,07	0,07
P25	23,00	14,70	8,07	1,17	6,95	9,50	0,09	0,10
P50	48,40	35,20	34,05	1,75	10,15	50,80	0,10	0,11
P75	236,73	64,58	203,90	3,98	24,12	63,30	0,12	0,13
Máximo	3000,00	291,90	2576,00	98,30	124,30	133,10	0,74	0,30
Valor p	0,1207		0,0003714		0,04384		0,2132	

El mejor árbol de clasificación incluyó la expresión adicional de kalikreína 12 y aumentó la sensibilidad para identificar ADC de pulmón hasta el 95% (19/20); sin embargo bajó la sensibilidad al 85% (17/20). Según este árbol, si la expresión de CA19.9 es baja, expresiones de kalikreína 12 < 10 ng/ml y > 20 ng/ml se asocian a MPM, mientras que expresiones entre 10 y 20 se asocian a ADC de pulmón.

Figura 20. Árbol de clasificación óptimo de las proteínas diferenciales entre adenocarcinoma vs. mesotelioma pleural maligno en la cohorte de validación



Se hizo un sistema de puntuación con puntos de corte óptimos, y se obtuvo el siguiente score, con una sensibilidad para identificar a los ADC de pulmón del 80% (16/20) y una especificidad del 95% (19/20) para identificar a los MPM.

$$\text{Score} = 3 * (\text{CA19.9} \geq 13,3 \text{ U/ml}) + 2 * (\text{kalikreína } 12 < 55 \text{ ng/ml}) + 1 * (\text{CA15.3} > 110 \text{ U/ml}).$$

Diferenciamos a los ADC de pulmón de los MPM con un Score > 3, con una sensibilidad del 65% (IC95% 40,8%-84,6%) y una especificidad del 100% (IC95% 83,2%-100%). El AUC fue de 0,94 (IC 0,88-1).

Comparación grupo de Linfoma vs. TBC

La catepsina B se validó en una muestra de 52 pacientes, 18 linfomas (5 de ellos con ADA>35 U/L) y 34 TBC (33 de ellas con ADA>35 U/L). Los valores encontrados en cada muestra se definen en la siguiente tabla.

Tabla 20. Distribución de la catepsina B entre TBC y linfomas en el grupo de validación

	Catepsina B (UI/ml)	
	TBC	Linfomas
N	34	18
Media	0,47	0,23
D.E.	0,44	0,24
Mínimo	0,07	0,06
P25	0,18	0,12
P50	0,34	0,17
P75	0,51	0,26
Máximo	1,97	1,16
Valor p	0,002869	

El árbol de clasificación óptimo incluyó la expresión de catepsina B. Al intentar definir el punto de corte de la catepsina B para diferenciar ambas entidades, se objetivó que variaba en función del valor de la ADA en el LP.

Con sólo el valor de la ADA en LP>35 U/L el punto de corte óptimo de la catepsina B fue <0,1775 ng/ml y alcanzó una sensibilidad del 80% y una especificidad del 75,8%.

En la muestra de los 52 pacientes con determinación de catepsina B el valor óptimo pasó a ser <0,31 ng/ml, con una sensibilidad del 88,9% y una especificidad del 61,8%.

Optimizando un punto de corte en la muestra de validación se definieron dos scores:

Score 1 = 1*(Cat.B < 0,1775 ng/ml) en pacientes con ADA>35 U/L

Score 2 = 1*(Cat.B < 0,31 ng/ml) en todos los pacientes

Para los casos con ADA>35 U/L, se diferenciaron los linfomas de las TBC mediante un score 1 > 0. La sensibilidad fue del 80%, con IC95%= (28,4%, 99,5%), y la especificidad del 75,8%, con IC95%= (57,7%, 88,9%). El AUC fue de 0,75 (IC 0,64-0,86).

En general, y sin tener en cuenta la ADA, se diferenció a los linfomas de las TBC mediante un Score2 > 0. La sensibilidad fue del 88,9%, con IC95%= (65,3%, 98,6%) y la especificidad del 61,8%, con IC95%= (43,6%, 77,8%).

Para diferenciar linfomas de TBC, la sensibilidad de este punto de corte fue del 94,4%, con un IC 95% (72,4%, 99,9%); pero disminuyó la especificidad y fue inferior al 50%. Por si sólo tiene una alta sensibilidad para detectar linfomas (94,4%), pero una baja especificidad para clasificar bien a los tuberculosos y no confundirlos con linfomas, (40,9%).

Por lo tanto, dada la baja especificidad no se valida como marcador único que permita diferenciar con sensibilidad y especificidad aceptables los TBC de los linfomas. Sí lo consigue cuando se combina en el perfil proteómico para diferenciar malignos de benignos.

Discusión

Diferenciación entre DPM y benignos

Catepsina B

Las catepsinas son enzimas lisosómicas implicadas en la degradación proteica. Hay al menos una docena de miembros de esta familia de enzimas, que se diferencian entre sí por su estructura y por la proteína sobre la que actúan. Su actividad suele desarrollarse en los lisosomas.

La existencia de procesos patológicos, oncológicos e inflamatorios, altera el transporte de las catepsinas hasta los lisosomas, secretándolas en forma de proenzimas a la matriz extracelular.

La catepsina B degrada los diferentes componentes de la matriz extracelular mediante su actividad dipeptidilcarboxipeptidasa o estimulando otras proteasas de la matriz extracelular y degradando sus inhibidores proteicos (Schwartz ,1995).

Existen referencias múltiples en la literatura médica sobre la participación activa de la catepsina B en la degradación de la matriz en varios cánceres humanos y podemos encontrarla elevada en tejidos neoplásicos de ADCs pulmonares, carcinomas escamosos, cáncer gástrico, colorrectales, próstata, mamario, gliomas y melanomas en relación a tejido sano (Krepela et al, 1989; Watabane et al, 1987).

En 1985 se describió la presencia de una forma secretora de la catepsina B en los exudados cancerosos de LP (Keppler et al, 1985) y se afirmó que su secreción es mayor que en tejidos sanos o DP benignos. Posteriormente, Petrova-Skalkova et al.

(1987) confirmaron la existencia de una forma latente de catepsina B en los DP secundarios a cáncer de mama.

En los últimos años, el uso de la tecnología de microarrays ha permitido la identificación de numerosos genes relacionados con el cáncer y las proteínas. Cordes et al (2009), Chen et al (2011), Gong et al (2013) publicaron que la expresión de catepsina B en piezas tumorales de sujetos con CPNM tenía valor pronóstico y sus niveles eran mayores que en pacientes sanos.

No existen datos sobre la determinación de catepsinas en LP y su relación con las diferentes patologías.

En nuestro estudio la catepsina B se encuentra elevada en los DP benignos. Si bien es cierto que los estudios mencionados, aunque no son comparables, apuntan a que debería estar más relacionada con patologías malignas, existen otros artículos que describen su implicación en enfermedades crónicas como podrían ser la artritis (Keyszer et al, 1998), pancreatitis (Greenberger et al, 1994); enfisema pulmonar (Lesser et al, 1992) y gingivitis (Kennet et al, 1997).

No existen tampoco estudios sobre catepsina B en DP secundarios a TBC.

MMP-9

Existen numerosos artículos que evalúan su presencia en DP de pacientes oncológicos y sus resultados son contradictorios (Di Carlo et al, 2005; 2007; Iglesias et al, 2005).

En la tabla 21 presentamos estudios relacionados con la medición de la MMP-9 en LP comparando DPM y benignos.

Tabla 21. Estudios sobre el valor MMP-9 en DP

Estudio	N	Población	MMP-9 DPM (ng/ml)	MMP-9 DP TBC (ng/ml)	Valor p
Jin et al, 2004	83	40 CP 27 TBC 16 cirrosis	226,6± 64,4	106,3± 30,1	< 0,01
Kwang et al, 2005	89	42 CP 37 TBC 12 Trasudados	8,8 (5,2-32,6)	35,3 (18,1-71,6)	< 0,001
Vatansever et al, 2009	61	22 DPM 24 TBC 15 no TBC no DPM	17,2± 7	49,5± 14,9	<0,01
Kremer et al, 2010	41	19 CP 22 DP benignos	0,2769	0,426±0,037	<0,0001
Hsieh et al, 2012	80	28 ADC P 20 TBC 32 neumonías	28,25	50	<0,01
Fiorelli et al, 2013	55	40 DPM 15 DP benignos	1200 (979-1423)	171 (145-872)	<0,0001

Observamos que en todos ellos existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores hallados en el DP en pacientes diagnosticados con DPM y DP benignos de diversas etiologías. En 4 de ellos (Kremer et al 2010, Hsieh et al, 2012, Vatansever et al, 2009 y Kwang et al, 2005) los valores son inferiores en los DPM. Otros dos estudios (Fiorelli et al, 2013 y Jin et al, 2004) presentan resultados contrarios.

Nuestros resultados están en concordancia con la mayoría de los datos publicados ya que los niveles de MMP-9 en LP de los pacientes con tumores malignos (MPM y ADC) fueron inferiores (valor del punto de corte de MMP-9<15,5 ng/ml) a los encontrados en los DP secundarios a TBC. Esto podría explicarse porque la actividad

de las MMP altera la integridad del mesotelio y aumenta su permeabilidad vascular (Park et al, 2005; Jantz et al, 2008). El daño tisular es una manifestación característica de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. En este sentido, la acción proteolítica de MMP puede estar implicada en la patogénesis de la TBC, como muchas otras enfermedades asociadas con la destrucción del tejido. Varios estudios han reportado que los macrófagos y monocitos liberan MMP-9 en respuesta a la TBC o sus componentes celulares (Rivera–Marrero et al, 2002; Hoheisel, 2001).

PCR

La proteína C reactiva (PCR) es un reactante de fase aguda, cuyo nivel aumenta en los procesos inflamatorios, siendo más sensible en los procesos infecciosos. Este incremento se debe a un aumento en la concentración plasmática de IL-6, que es producida por los macrófagos, las células endoteliales, los linfocitos T y los adipocitos. En cambio, su producción se ve disminuida por efecto de la insulina, así como la de otras proteínas de fase aguda. Su determinación es útil en la evaluación y seguimiento de los procesos inflamatorios sistémicos.

Con respecto a la PCR, existen diversos estudios (tabla 22) que coinciden en apuntar que los valores de PCR más elevados se corresponden con patologías inflamatorias y que es un buen marcador para diferenciar en DP un DPM de un DP tuberculoso.

Tabla 22. Estudios sobre la PCR en LP para diferenciar DPM de DP benignos

Estudio	N	PCR DPM (mg/L)	PCR DP TBC (mg/L)	Valor p	Punto corte (mg/L)	Sensibilidad	Especificidad
Chierakul et al, 2004	148	0,30 ± 0,16	0,52 ± 0,18	< 0,001	0,45	0,60	0,89
Botana Rial et al, 2011	100	11,8 (5,1-22)	33,1 (16,8-52,1)	0,001	16,7	0,75	0,68

Los resultados de nuestro estudio coinciden con los datos publicados, confirmando la presencia de mayores niveles de PCR en pacientes con etiología benigna (TBC) que maligna. Además la PCR resultó significativa y fue incluida en el algoritmo de diferenciación entre ambos grupos en la cohorte de validación con un punto de corte <12,5 mg/L para detectar DPM.

Condroitín sulfato

El CS es un glucosaminoglucano sulfatado que se encuentra habitualmente asociado a proteínas constituyendo agregados de alto peso molecular denominados proteoglicanos. Es un importante componente de la mayoría de los tejidos de los vertebrados y está presente en la matriz extracelular.

Apenas existen datos publicados sobre la expresión de CS en LP. Uno de los pocos estudios realizados en 1986 por Nakano et al, sobre glicosaminoglucano (GAG) es en tejido tumoral de 7 pacientes con MPM y 7 con ADC pulmonar. Se encontró que el promedio de la cantidad total de GAG era 7,9 veces más alta en el MPM que en el ADC del pulmón y que el ácido hialurónico y CS son componentes principales de GAG del MPM. En el LP, la cantidad de CS era de 11 a 87 veces más alta que en el ADC del pulmón, lo que sugiere que es característico del MPM.

En nuestro estudio, los valores obtenidos en la cohorte de validación indican que no hay diferencias significativas cuando se analiza dicho marcador por separado entre DP benignos y malignos (1,20 ng/ml en TBC vs. 1,30 en DPM) pero es discretamente mayor en los DPM, dato que podría explicarse por el aumento de esta proteína en MPM. La CS, –combinada con las otras proteínas en un score–, permite diferenciar los DPM con un punto de corte > 1,25 ng/ml.

Diferenciación entre ADC y MPM

Existen diversas publicaciones sobre marcadores con el objetivo de diferenciar ambas entidades. Mayoritariamente, se analizan en el bloque tumoral o en sangre periférica. Hay pocas publicaciones sobre marcadores tumorales en LP.

CA19.9 y CA15.3

Un artículo reciente de Wang et al (2014), evaluó los niveles pleurales del CEA, AFP, CA12.5, CA15.3 y CA19.9 como marcadores diagnósticos en un estudio retrospectivo. Incluyeron un total de 251 pacientes (128 ADC pulmonar, 34 escamoso pulmonar, 11 de mama, 18 MPM, 17 CPM, 13 linfomas y 30 misceláneas). Los resultados de los DP secundarios a ADC y MPM se muestran en las tablas 25 y 26.

Tabla 23. Distribución del CA15.3 y CA19.9 en el estudio Wang et al (2014)

Marcador	ADC p	Mesotelioma
CA15.3(U/ml)	138,6±19,3	21,3±6,7
CA19.9(U/ml)	516,6±72,4	181,5±116,5

Los niveles de CA15.3 y CA19.9 fueron mayores en los ADC frente a los MPM.

Tabla 24. AUC e intervalo de confianza del CA15.3 y CA19.9 en el estudio Wang et al (2014)

	CA15.3			CA19.9		
	AUC	P	IC95%	AUC	P	IC95%
ADC pulmonar	0,838	0	0,787, 0,888	0,698	0	0,633, 0,763
MPM	0,635	0,056	0,513, 0,758	0,572	0,311	0,437, 0,707

La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en los niveles de CA15.3 ($p < 0,01$) y CA19.9 ($p < 0,01$). El CA15.3 fue el mejor biomarcador para el diagnóstico de los DP de ADC vs. MPM (AUC:0,838); punto corte:10,2 U/ml; con una sensibilidad del 73,2% (IC 64,4 a 80,8%) y especificidad del 85,2% (IC95% 77,8-90,8).

Estos datos avalan nuestros resultados: el CA15.3 y el CA19.9 son superiores en los DP con ADC vs. MPM.

Kalikreína 12

La kalikreína 12 forma parte de la familia de las kalikreínas (son 15 miembros) relacionadas con la serina peptidasa, involucradas en la proliferación, migración, invasión, diferenciación, inflamación y angiogénesis de los procesos patológicos, como el cáncer (Fuhrman-Luck et al, 2014).

Las kalikreínas 2, 4, 11, 15 se encuentran descritas en la bibliografía y están sobreexpresadas en el DP pero no se dispone de estudios específicos de la kalikreína 12.

Mesotelina

La mesotelina está descrita como biomarcador en LP utilizado para el diagnóstico del mesotelioma pleural maligno (MPM) y que proporciona un valor diagnóstico adicional a la citología (Canesa et al, 2013).

En el presente estudio, dicha proteína no presentó una diferencia de expresión significativa. Ya existen casos en la literatura en los que la mesotelina no es relevante en un análisis comparativo (Zhang et al, 2012; Creaney et al, 2015). Estos autores dan como explicación posible que la expresión de la mesotelina es diferente en función del tejido analizado, siendo menor su expresión en el DP. La expresión de mesotelina depende, según los autores mencionados de la precocidad del diagnóstico, de las muestras biológicas utilizadas (ya sea de tejido tumoral, líneas celulares o derrames) y de los grupos de comparación evaluados. En nuestro estudio la expresión de la mesotelina no salió significativa en el grupo de MPM.

Diferenciación entre DP tuberculoso y linfoma

En 2012, Antonangelo et al. realizaron un estudio descriptivo de las características clínicas y analíticas del DP TBC vs. linfomas, con el fin de identificar variables que pudieran contribuir a su diferenciación. En los linfomas, la citología fue positiva, sospechosa, y negativa el 51,8%, 24,1%, y 24,1% respectivamente.

Los resultados de las determinaciones en LP se describen en la tabla 25.

Tabla 25. Comparación de variables bioquímicas en LP entre TBC y linfoma

Variable	Tuberculosis (n= 130)	Linfoma (n=29)	P
Glucosa (mg/dL)	70,0 (55,0- 82,0)	83,5 (53,0-103,0)	0,053
Proteínas (g/dL)	5,3 (4,9-5,7)	4,1 (2,9-4,4)	<0,001
Albúmina (g/dL)	2,6 (2,3-3,0)	2,5 (2,0-2,8)	0,018
LDH (U/L)	740 (553-952)	561 (355-1567)	0,454
Colesterol (mg/dL)	85 (70-100)	68,0 (60,0-85,0)	0,008
Triglicéridos (mg/dL)	31,5 (25,0-40,0)	34,0 (22,0-75,0)	0,289
Amilasa (U/L)	54 (42-68)	39 (24-57)	0,012
ADA (IU/L)	97 (77-128)	66 (41-99)	<0,001

Hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de proteínas, albúmina, colesterol, amilasa y ADA, siendo en todos los casos superiores los niveles en el grupo de TBC. Estos autores concluyeron que los niveles de proteínas y ADA en LP tendían a ser más altos en el grupo de la TBC aunque, en algunos casos, estas variables mostraron una superposición. Sin embargo, ninguno de los pacientes del grupo de la TBC tenía niveles de ADA en LP por debajo del punto de corte de 40 U/L.

En nuestra base de datos de DP (>3000 casos) se ha comprobado la existencia de algunos casos de linfomas confirmados con ADA>40 (40%) (Porcel et al, 2010), que

plantea una dificultad diagnóstica y es el motivo por el cual nos planteamos, en parte, este trabajo.

De la relación entre las catepsinas y los linfomas, existen datos publicados sobre la respuesta al tratamiento y pronóstico pero ningún dato sobre su determinación en LP y el valor diagnóstico en los linfomas de la catepsina B.

Una posible explicación a la discordancia entre los valores de la catepsina B en la cohorte de validación y de derivación podría ser que había diferencias estadísticamente significativas en los valores de ADA en ambas poblaciones. El porcentaje de linfomas con ADA>35 U/L en la cohorte de derivación era del 100% y en la de derivación del 27,8% ($p<0,001$). Podría ser que el valor de la catepsina B fuera buen marcador en los casos con ADA elevada.

A su vez, la inclusión de la proteína V-CAM1 podría haber sido de utilidad – combinada junto con la catepsina B– para la diferenciación de TBC y linfoma dado que era la otra proteína la que salía significativa por varios métodos en la cohorte de derivación. Habría que valorarlo en un nuevo estudio. La bibliografía describe relación de la VCAM-1 en el DP eosinofílico (definido por >10% eosinófilos (Kalomenidis et al., 2003)) pero no existen estudios sobre la VCAM en el DP secundario a linfomas.

La excelente sensibilidad y especificidad iniciales de la catepsina B hicieron que no nos planteáramos dicha opción. No existen, de todas formas, en la literatura médica datos sobre el valor diagnóstico ni pronóstico de la V-CAM1 en relación con DP y los linfomas.

Limitaciones del estudio

El número de sujetos que incluimos en este estudio fue el mínimo necesario para poder obtener resultados con suficiente potencia estadística en la cohorte de derivación. En la cohorte de validación, uno de los factores limitantes del estudio fue la escasa muestra de DP secundarios a linfoma con ADA elevada (27,8%). Siempre es deseable disponer de un mayor tamaño muestral.

En el estudio utilizamos como DP benignos exclusivamente sujetos con DP secundario a TBC con ADA alta. Este hecho, hace que no podamos extrapolar los datos obtenidos a los DP benignos secundarios a otras patologías como la neumonía, la insuficiencia cardíaca, etc.

Otra de las posibles limitaciones de este estudio es que se presupuso que la estabilidad de las proteínas en las muestras congeladas y su determinación en el DP no se afectan por el paso del tiempo. La fecha de toracocentesis del DP más antiguo utilizado data de 1991. Este tema podría ser controvertido y más tratándose de parámetros tan poco habituales como los estudiados. Existe un estudio, realizado con la misma base de datos (Bielsa et al, 2014) sobre estabilidad de la ADA y se concluyó que sí había pérdida de actividad con el paso de los años. No existen estudios sobre medición inmunológica (por inmunoensayo) de una proteína, por lo que no podemos saber si se ve afectada.

Además existe una limitación inherente a la plataforma tecnológica utilizada. No hay, sin embargo, ninguna tecnología proteómica que de forma aislada pueda identificar el proteoma completo (proteínas de gran o de escasa abundancia) del LP y cada procedimiento tiene sus ventajas e inconvenientes. Dado que nuestro interés es utilizar un método con potencial aplicación clínica (kit comercializado, tecnología al alcance de un laboratorio medio, simplicidad y consistencia de la técnica) nos decidimos por una

plataforma de micromatrices proteínicas que contiene un número substancial de moléculas relacionadas con cáncer. Esto significa que nuestros resultados necesariamente están limitados por la bondad de los 120 biomarcadores contenidos en el chip.

Con respecto al estudio de validación, las principales limitaciones vienen dadas por la diferente técnica utilizada al realizar el estudio inicial y su validación posterior. Aún así, servirá para validar los perfiles identificados en el primer análisis tras la determinación de los nuevos puntos de corte. Sería necesaria una nueva muestra para aplicar las mismas técnicas de evaluación de la expresión de las proteínas seleccionadas y validar los nuevos puntos de corte.

Conclusiones

1. Existen diferencias en el perfil proteómico de los DP de los tres subgrupos analizados (DPM vs. DP benignos; ADC vs. MPM y linfoma vs. TBC).
2. Una combinación de 4 proteínas evaluadas en LP (PCR, Catepsina B, MMP-9 y Condroitín sulfato), integradas en un sistema de puntuación, tiene alta capacidad para discriminar DPM de DP secundarios a TBC.
3. Una combinación de 3 proteínas evaluadas en LP (CA19.9, CA15.3 y Kalikreína 12), integradas en un sistema de puntuación, diferenciaría con buena precisión los DP secundarios a ADC de MPM.
4. La catepsina B no sirve como único marcador diferencial entre linfomas y TBC por su baja especificidad aunque en los DP con ADA alta ($ADA > 35$ U/L) presenta buena sensibilidad y aceptable especificidad. La combinación con otros posibles marcadores (VCAM-1) debería ser explorada en nuevos estudios.

Bibliografía

1. Alatas F, Alatas Ö, Metintas M, Colak Ö, Harmanci E, Demir S. Diagnostic value of CEA, CA 15.3, CA 19.9, Cyfra 21.1, NSE and TSA assay in pleural effusions. *Lung Cancer*. 2001 Jan; 31 (1):9-16.
2. Alemán C, Porcel JM, Segura RM et al. Pleural fluid mesothelin for the differential diagnosis of exudative pleural effusions. *Med Clin (Barc)*. 2009 Oct; 133(12):449–453.
3. Amany FM, Mohamed NA, El-Ghamry R, et al. Mesothelin and osteopontin as diagnostic and prognostic markers of malignant pleural mesothelioma in Egyptian patients undergoing pleurodesis. *Egyptian J Chest Dis Tuberc* 2013;62:115–20.
4. Ashour WM, Amin H, Sabri IM, et al. Combined blood and pleural levels of mesothelin and osteopontin for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Egyptian J Chest Dis Tuberc* 2012; 61: 121–8.
5. Bard MP, Hegmans JP, Hemmes A, et al. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31:114-21.
6. Bielsa S, Esquerda A, Palma RM, Criado A, Porcel JM. Influence of Storage Time on Pleural Fluid Adenosine Deaminase Activity. *Clin Lab*. 2014;60(3):501-504.
7. Blanquart C, Gueugnon F, Nguyen JM, et al. CCL2, galectin-3, and SMRP combination improves the diagnosis of mesothelioma in pleural effusions. *J Thorac Oncol* 2012;7:883–9.
8. Borrebaeck CA, Wingren C. High-throughput proteomics using antibody microarrays: an update. *Expert Rev Mol Diagn*. 2007;7(5):673-86.
9. Botana-Rial M, Casado-Rey P, Leiro-Fernández V, Andrade-Olivié M, Represas-Represas C, Fernández-Villar A. Validity of procalcitonin and C-reactive protein

measurement when differentiating between benign and malignant pleural effusion.

Clin Lab. 2011;57(5-6):373-378.

10. Caiazzo RJ, Maher AJ, Drummond MP, et al. Protein microarrays as an application for disease biomarkers. *Proteomics Clin Appl*. 2009 Febr;3(2):138-147.
11. Canessa PA, Franceschini MC, Ferro P, et al. Evaluation of soluble mesothelin-related peptide as a diagnostic marker of malignant pleural mesothelioma effusions: its contribution to cytology. *Cancer Invest* 2013 Jan; 31(1):43–50.
12. 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 Mar; 9(1):66-69.
13. Fuhrman-Luck RA, Silva ML, Dong Y, Irving-Rodgers H, Stoll T, Hastie ML, Loessner D, Gorman JJ, Clements JA. Proteomic and other analyses to determine the functional consequences of deregulated kallikrein-related peptidase (KLK) expression in prostate and ovarian cancer. *Proteomics Clin Appl*. 2014 Jun; 8(5-6):403-415.
14. Cordero OJ, De Chiara L, Lemos-González Y, et al. How the measurements of a few serum markers can be combined to enhance their clinical values in the management of cancer. *Anticancer Res*. 2008 Jul-Aug;28(4C):2333-2341.
15. Cordes C, Bartling B, Simm A, Afar D, Lautenschlager C, Hansen G, Silber RE, Burdach S, Hofmann HS. Simultaneous expression of Cathepsins B and K in pulmonary adenocarcinomas and squamous cell carcinomas predicts poor recurrence-free and overall survival. *Lung Cancer*. 2009 Apr; 64(1):79-85.
16. Creaney J, Sneddon S, Dick IM, et al. Comparison of the diagnostic accuracy of the MSLN gene products, mesothelin and megakaryocyte potentiating factor, as biomarkers for mesothelioma in pleural effusions and serum. *Dis Markers* 2013;35:119–27.

17. Creaney J, Dick IM, Meniawy TM, Leong SL, Leon JS, Demelker Y, Segal A, Musk AW, Lee YC, Skates SJ, Nowak AK, Robinson BW. Comparison of fibulin-3 and mesothelin as markers in malignant mesothelioma. *Thorax*. 2014 Oct; 69(10):895-902.
18. Creaney J, Dick IM, Robinson BW. Comparison of mesothelin and fibulin-3 in pleural fluid and serum as markers in malignant mesothelioma. *Curr Opin Pulm Med*. 2015 Jul; 21(4):352-356.
19. Cui A, Jin XG, Zhai K, Tong ZH, Shi HZ. Diagnostic values of soluble mesothelin-related peptides for malignant pleural mesothelioma: updated meta-analysis. *BMJ Open*. 2014 Feb 24; 4(2):e004145.
20. Das DK. Serous effusions in malignant lymphomas: a review. *Diagn Cytopathol*. 2006 May; 34(5):335-347.
21. Davies HE, Sadler RS, Bielsa S et al. Clinical impact and reliability of pleural fluid mesothelin in undiagnosed pleural effusions. *Am J Respir and Crit Care Med*. 2009; 180(5):437-444.
22. Di Carlo A, Terracciano D, Mariano A, Macchia V. Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 type IV collagenases in serum of patients with pleural effusions. *Int J Oncol*. 2005 May; 26(5):1363-1368.
23. Di Carlo A, Mariano A, Terracciano D, Mazzeo C, Galzerano S, Cicalese M, Cecere C, Macchia V. Gelatinolytic activities (matrix metalloproteinase-2 and -9) and soluble extracellular domain of Her-2/neu in pleural effusions. *Oncol Rep*. 2007 Aug; 18 (2):425-431.
24. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC.

25. Ferrer J, Villarino MA, Encabo G, Felip E, Bermejo B, Vilá S, et al. Diagnostic utility of Cyfra 21.1, carcinoembryonic antigen, CA 125, neuron specific enolase, and squamous cell antigen level determinations in the serum and pleural fluid of patients with pleural effusions. *Cancer*. 1999 Oct 15; 86(8):1488-1495.
26. Filiberti R, Parodi S, Libener R, Ivaldi GP, Canessa PA, Ugolini D, Bobbio B, Marroni P. Diagnostic value of mesothelin in pleural fluids: comparison with CYFRA 21-1 and CEA. *Med Oncol*. 2013 Jun;30(2):543.
27. Fiorelli A, Morgillo F, Fasano M, Vicidomini G, Di Crescenzo VG, Di Domenico M, Accardo M, Santini M. The value of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor receptor 1 pathway in diagnosing indeterminate pleural effusion. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2013 Mar; 16(3):263-269.
28. Fujimoto N, Gemba K, Asano M, et al. Soluble mesothelin-related protein in pleural effusion from patients with malignant pleural mesothelioma. *Exp Ther Med* 2010 Mar; 1(2):313–317.
29. Gini, C. (1912). "Variabilità e mutabilità", C. Cuppini, Bologna, 156 pages. Reprinted in *Memorie di metodologica statistica* (Ed. Pizetti E, Salvemini, T). Rome: Libreria Eredi Virgilio Veschi (1955).
30. Gong F, Peng X, Luo C, Shen G, Zhao C, Zou L, Li L, Sang Y, Zhao Y, Zhao X. Cathepsin B as a potential prognostic and therapeutic marker for human lung squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*. 2013 Oct 20; 12(1):125.
31. González-Buitrago JM, Ferreira L, Muñoz MC. Proteómica clínica y nuevos biomarcadores en los líquidos biológicos. *Med Clin (Barc)*. 2008 Oct; 131(11):426-434.
32. Greenberger NJ, Toskes PP, Isselbacher KI. Pancreatitis aguda y crónica. En : Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martín JB, Fauci AS, Kasper DL editores.

- Harrison, Principios de Medicina Interna, 13ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España. 1994; p. 1748-1762.
33. Grigoriu BD, Grigoriu C, Chahine B, Gey T, Scherpereel A. Clinical utility of diagnostic markers for malignant pleural mesothelioma. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2009 Mar; 71(1):31-38.
 34. Grigoriu BD, Chachine B, Vachani A, Gey T, Conti M, Sterman DH, et al. Kinetics of soluble mesothelin in patients with malignant pleural mesothelioma during treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 May 15; 179(10):950-954.
 35. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Jul 21; 91(14):1194–1210.
 36. Hegmans JP, Veltman JD, Fung ET, et al. Protein profiling of pleural effusions to identify malignant pleural mesothelioma using SELDI-TOF MS. *Technol Cancer Res Treat* 2009 Oct;8(5):323-332.
 37. Hoheisel G, Sack U, Hui DS et al. Occurrence of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in tuberculous pleuritis. *Tuberculosis*. 2001; 81(3):203–209.
 38. Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*. 1979; 6(2): 65–70.
 39. Hooper CE, Morley AJ, Virgo P, et al. A prospective trial evaluating the role of mesothelin in undiagnosed pleural effusions. *Eur Respir J* 2013; 41:18–24.
 40. Hosako M, Muto T, Nakamura Y, Tsuta K, Tochigi N, Tsuda H, Asamura H, Tomonaga T, Kawai A, Kondo T. Proteomic study of malignant pleural mesothelioma by laser micro dissection and two-dimensional difference gel electrophoresis identified cathepsin D as a novel candidate for a differential diagnosis biomarker. *J Proteomics*. 2012 Jan 4; 75(3):833-44.

41. Hsieh WY, Chen MW, Ho HT, You TM, Lu YT. Identification of differentially expressed proteins in human malignant pleural effusions. *Eur Respir J.* 2006 Dec; 28(6):1178-1185.
42. Hsieh WY, Kuan TC, Cheng KS, Liao YC, Chen MY, Lin PH, Hsu YC, Huang CY, Hsu WH, Yu SY, Lin CS. ACE/ACE2 ratio and MMP-9 activity as potential biomarkers in tuberculous pleural effusions. *Int J Biol Sci.* 2012; 8(8):1197-1205.
43. Iglesias D, Alegre J, Alemán C, Ruíz E, Soriano T, Armadans LI, Segura RM, Anglés A, Monasterio J, de Sevilla TF. Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in exudative pleural effusions. *Eur Respir J.* 2005 Jan; 25(1):104-149.
44. Jantz MA, Antony VB. Pathophysiology of the pleura. *Respiration.* 2008; 75(2): 121–133.
45. Jett JR. Mesotelioma maligno. En: Albert R, Spiro S, Jett J, editores. *Tratado de Neumología.* Madrid:Harcourt; 2001.p.67.1-67.6.2.
46. Jin HY, Lee KS, Jin SM, Lee YC. Vascular endothelial growth factor correlates with matrix metalloproteinase-9 in the pleural effusion. *Respir Med.* 2004 Feb; 98(2):115-122.
47. Jung SH. Sample size for FDR-control in microarray data analysis. *Bioinformatics.* 2005 Jul 15; 21(14):3097-3104.
48. Kalomenidis I, Mohamed KH, Lane KB, Peebles RS, Barnette R, Rodriguez RM, Light RW. Pleural fluid levels of vascular cell adhesion molecule-1 are elevated in eosinophilic pleural effusions. *Chest.* 2003 Jul; 124(1):159-166.
49. Kennet CN, Cox SW Eley BM. Ultrastructural localization of cathepsin B in gingival tissue from chronic periodontitis patients. *Histochem J.* 1997 Oct; 29(10): 727-734.

50. Keppler D, Pagano M, Dalet-Fumeron V, Engler R. Regulation of neoplasm-specific cathepsin B by cysteine-protease inhibitors present in cancerous exudates. *C R Acad Sci III*. 1985; 300(13):471-474.
51. Keyszer G, Lambiri I, Keysser M, Keysser C, Nagel R, Buemester GR et al. Matrix metalloproteinases, but not cathepsins B, H and L or their inhibitors in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis are potentially useful markers of disease activity. *Z Rheumatol*. 1998 Dec; 57(6):392-398.
52. Krepela E, Vicar J, Cernoch V. Cathepsin B in human breast tumor tissue and cancer cells. *Neoplasma*. 1989; 36(1):41-52.
53. Kuralay F, Tokgöz Z, Cömlekci A. Diagnostic usefulness of tumour marker levels in pleural effusions of malignant and benign origin. *Clin Chim Acta*. 2000; 300:43-45.
54. Lesser M, Padilla ML, Cardozo C. Induction of emphysema in hamster by intratracheal instillation of cathepsin B. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Mar; 145(3):661-668.
55. Lehtiö J, De Petris L. Lung cancer proteomics, clinical and technological considerations. *J Proteomics*. 2010 Sep 10; 73(10):1851-1863.
56. Li Y, Lian H, Jia Q, Wan Y. Proteome screening of pleural effusions identifies IL1A as a diagnostic biomarker for non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Feb 6;457(2):177-82.
57. Liang QL, Shi HZ, Qin XJ, et al. Diagnostic accuracy of tumour markers for malignant pleural effusion: a meta-analysis. *Thorax*. 2008 Jan; 63(1):35-41.
58. Liang QL, Shi HZ, Wang K, et al. Diagnostic accuracy of adenosine deaminase in tuberculous pleurisy: a meta-analysis. *Respir Med*. 2008 May; 102(5):744-754.
59. Light RW. Clinical practice. Pleural effusion. *N Engl J Med*. 2002 Jun 20; 346(25):1971-1977.

60. Lin RT, Takahashi K, Karjalainen A, Hoshuyama T, Wilson D, Kameda T, et al. Ecological association between asbestos-related diseases and historical asbestos consumption: An international analysis. *Lancet*. 2007 Mar 10; 369(9564):844-849.
61. Liu PJ, Chen CD, Wang CL, Wu YC, Hsu CW, Lee CW, Huang LH, Yu JS, Chang YS, Wu CC, Yu CJ. In-depth proteomic analysis of six types of exudative pleural effusions for nonsmall cell lung cancer biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics*. 2015 Apr;14(4):917-32.
62. Montes I, Abu Shams K, Alday E, Carretero Sastre JL, Ferrer Sancho J, Freixa Blanxart A, et al. Normativa sobre el asbesto y sus enfermedades pleuropulmonares. *Arch Bronconeumol*. 2005 Mar; 41(3):153-168.
63. Nakano T, Fujii J, Tamura S, Amuro Y, Nabeshima K, Horai T, Hada T, Higashino. Glycosaminoglycan in malignant pleural mesothelioma. *Cancer*. 1986 Jan 1; 57(1):106-10.
64. Ordóñez N. Value of thyroid transcription factor-1, E-Cadherin, BG8, WT1 and CD44S immunostaining in distinguishing epithelial pleural mesothelioma from pulmonary and nonpulmonary adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2000 Apr; 24(4):598-606.
65. Paganuzzi M, Onetto M, Marron.i, Filiberti R, Tassara E, Parodi S, et al. Diagnostic value of Cyfra 21.1 tumor marker and CEA in pleural effusion due to mesotelioma. *Chest*. 2001 Apr; 119(4):1138-1142.
66. Park KJ, Hwang SC, Sheen SS et al. Expression of matrix metalloproteinase–9 in pleural effusions of tuberculosis and lung cancer. *Respiration*. 2005 Mar-Apr; 72(2):166–175.
67. Pass HI, Wali A, Tang N et al. Soluble mesothelin-related peptide level elevation in mesothelioma serum and pleural effusions. *Ann Thorac Surg*. 2008; 85(1):265–272.

68. Pass HI, Levin SM, Harbut MR, et al. Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma. *N Engl J Med*. 2012 Oct; 367(15):1417–1427.
69. Pernemalm M, De Petris L, Eriksson H, Brandén E, Koyi H, Kanter L, Lewensohn R, Lehtiö J. Use of narrow-range peptide IEF to improve detection of lung adenocarcinoma markers in plasma and pleural effusion. *Proteomics*. 2009 Jul; 9(13):3414-3424.
70. Petrova-Skalková D, Krepela E, Rasnick D, Vicar J. A latent form of cathepsin B in pleural effusions. I. Characterization of the enzyme in breast cancer patients. *Biochem Med Metab Biol*. 1987 Oct; 38(2):219-227.
71. Plathow C, Staab A, Schmaehl A, Aschoff P, Zuna I, Pfannenbergl C, et al. Computed tomography, positron emission tomography, positron emission tomography/computed tomography, and magnetic resonance imaging for staging of limited pleural mesothelioma: Initial results. *Invest Radiol*. 2008 Oct; 43(10):737-744.
72. Porcel JM, Vives M. Differentiating tuberculous from malignant pleural effusions: a scoring model. *Med Sci Monit*. 2003 May; 9(5):CR175-180.
73. Porcel JM, Vives M, Esquerda A, et al. Use of a panel of tumor markers (carcinoembryonic antigen, cancer antigen 125, carbohydrate antigen 15-3, and cytokeratin 19 fragments) in pleural fluid for the differential diagnosis of benign and malignant effusions. *Chest*. 2004 Dec; 126(6):1757-1763.
74. Porcel JM. Pruebas diagnósticas. Estudio del derrame pleural. *JANO (revista en línea)* 2009;(1.755):25-29.
75. Porcel JM, Rodríguez-Panadero F. Malignant effusions. En: Maskell N, Millard A, (eds.). *Oxford Desk Reference Respiratory Medicine*. Oxford University Press, Oxford; 2009:342–344.

76. Porcel JM. Tuberculous pleural effusion. *Lung*. 2009 Sep-Oct; 187(5):263-270.
77. Porcel JM, Vives M, Cao G, Bielsa S, Ruiz-González A, Martínez-Iribarren A, Esquerda A. Biomarkers of infection for the differential diagnosis of pleural effusions. *Eur Respir J*. 2009 Dec; 34(6):1383-1389.
78. Porcel JM, Esquerda A, Bielsa S. Diagnostic performance of adenosine deaminase activity in pleural fluid: a single-center experience with over 2100 consecutive patients. *Eur J Intern Med*. 2010 Oct; 21(5):419-423.
79. Porcel JM. Pleural fluid biomarkers: beyond the Light criteria. *Clin Chest Med*. 2013 Mar; 34(1):27-37.
80. Porcel JM, Esquerda A, Vives M, Bielsa S. Etiología del derrame pleural: análisis de más de 3.000 toracocentesis consecutivas. *Arch Bronconeumol*. 2014 May; 50(5):161-165.
81. Pu RT, Giordano TJ, Michael CW. Utility of cytology microarray constructed from effusion cell blocks for immunomarker validation. *Cancer*. 2008 Oct 25; 114(8):300-306.
82. Rivera–Marrero CA, Schuyler W, Roser S et al. M. tuberculosis induction of matrix metalloproteinase–9: The role of mannose and receptor–mediated mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 82: 546–555.
83. Rodríguez Panadero F. Diagnóstico y tratamiento del mesotelioma pleural maligno. *Arch Bronconeumol*. 2015 Apr; 51(4):177-184.
84. Rodríguez-Piñeiro AM, Blanco-Prieto S, Sánchez-Otero N, et al. On the identification of biomarkers for non-small cell lung cancer in serum and pleural effusion. *J Proteomics* 2010 Jun 16; 73(8):1511-1522.

85. Romero S, Fernández C, Arriero JM, Espasa A, Candela A, Martín C, Sánchez-Payá J. CEA, CA 15-3 and CYFRA 21-1 in serum and pleural fluid of patients with pleural effusions. *Eur Respir J.* 1996 Jan; 9(1):17-23.
86. Salama G, Miedouge M, Rouzaud P, Mauduyt MA, Pujazon MC, Vincent C, et al. Evaluation of pleural Cyfra 21.1 and carcinoembryonic antigen in the diagnosis of malignant pleural effusions. *Br J Cancer.* 1998; 77(3):472-476.
87. Sánchez-Otero N, Bielsa S, Porcel JM. Proteomics in pleural effusions. *Lederma.*
88. Schwartz MK. Tissue cathepsins as tumor markers. *Clinica Chimica Acta.* 1995 Jun 15; 237(1-2):67-68.
89. Scherpereel A, Grigoriu B, Conti B et al. Soluble mesothelin-related peptides in the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am J Resp Crit Care Med.* 2006 May; 173(10):1155–1160.
90. Sharif S, Zahid I, Routledge T, Scarci M. Does positron emission tomography offer prognostic information in malignant pleural mesothelioma?. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2011 May; 12(5):806-811.
91. Soltermann A, Ossola R, Kilgus-Hawelski S, von Eckardstein A, Suter T, Aebersold R, Moch H. N-glycoprotein profiling of lung adenocarcinoma pleural effusions by shotgun proteomics. *Cancer.* 2008 Apr 25; 114(2):124-133.
92. Thongboonkerd V. Proteomics of human body fluids: principles, methods, and applications. Totowa, N.J: Humana Press; 2007.
93. Thun MJ, Henley SJ, Calle EE. Tobacco use and cancer: an epidemiologic perspective for geneticists. *Oncogene.* 2002; 12:7307–7325.
94. Tyan YC, Wu HY, Lai WW, et al. Proteomic profiling of human pleural effusion using two-dimensional nano liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2005 Jul-Aug; 4(4):1274-1286.

95. Tyan YC, Wu HY, Su WC, et al. Proteomic analysis of human pleural effusion. *Proteomics*. 2005 Mar; 5(4):1062-1074.
96. Ustun H, Borazan A, Bilgicli N, Yilmaz A. Diagnostic value of tumoral markers in pleural effusions. *Int J Clin Pract*. 2004 Jan; 58(1):22-25.
97. Vatansever S, Gelisgen R, Uzun H, Yurt S, Kosar F. Potential role of matrix metalloproteinase-2,-9 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1,-2 in exudative pleural effusions. *Clin Invest Med*. 2009 Aug 1; 32(4):E293-300.
98. Villena V, López Encuentra A, Echave-Sustaeta J, Martín Escribano P, Ortuño de Solo B, Estenoz Alfaro J. Diagnostic value of CA 72.4, carcinoembryonic antigen, CA 15.3 and CA 19.9 assay in pleural fluid: a study of 207 patients. *Cancer*. 1996 Aug 15; 78(4):736-740.
99. Villena V, López-Encuentra A, Echave-Sustaeta J, Martín-Escribano P, Ortuño de Solo B, Estenoz-Alfaro J. Diagnostic value of CA 549 en pleural fluid. Comparasion with CEA, CA 15.3 and CA 72.4. *Lung Cancer*. 2003 Jun; 40(3):289-294.
100. Wang L, Liu L, Shi Y, Cao H, Chaturvedi R, Calcutt MW, Hu T, Ren X, Wilson KT, Polk DB, Yan F. Berberine induces caspase-independent cell death in colon tumor cells through activation of apoptosis-inducing factor. *PLoS One*. 2012; 7(5):e36418.
101. Wang XF, Wu YH, Wang MS, Wang YS. CEA, AFP, CA125, CA153 and CA199 in malignant pleural effusions predict the cause. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(1): 363-368.
102. Wang ZJ, Reddy GP, Gotway MB, Higgins CB, Jablons DM, Ramaswamy M, et al. Malignant pleural mesothelioma: Evaluation with CT MR imaging, and PET. *Radiographics*. 2004 Jan-Feb; 24(1):105-119.

103. Watanabe M, Higashi T, Watanabe A, Osawa T, Sato Y, Kimura Y et al. Cathepsin B and L activities in gastric cancer tissue: correlation with histological findings. *Biochem Med Metabol Biol.* 1989 Aug; 42(1):21-29.
104. Yamada S, Tabata C, Tabata R, Fukuoka K, Nakano T. Clinical significance of pleural effusion mesothelin in malignant pleural mesothelioma. *Clin Chem Lab Med.* 2011; (49(10):1721–1726.
105. Yu CJ, Wang CL, Wang CI, et al. Comprehensive proteome analysis of malignant pleural effusion for lung cancer biomarker discovery by using multidimensional protein identification technology. *J Proteome Res* 2011 Oct 7;10(10):4671-4682.
106. Zhang Y, Fu H, Zhang Y. Value of immunohistochemistry in distinguishing malignant epithelial tumors in the pleura. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2007 Aug 20; 10(4):320-323.