



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y PSIQUIATRÍA

**ESTADO NUTRICIONAL EN VITAMINA D Y PÉPTIDOS  
ANTIBIÓTICOS VITAMINA D DEPENDIENTES (CATELICIDINA  
Y  $\beta$ -2-DEFENSINA) EN SANGRE Y LÍQUIDO PLEURAL:  
POSIBLES IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS Y  
DIAGNÓSTICAS EN LOS DERRAMES PLEURALES.**

**Carlos Antonio Amado Diago**

Tesis presentada para aspirar al grado de Doctor en Medicina, realizada bajo la dirección de las Doctoras:

**M. Carmen Fariñas Álvarez**

**María Teresa García Unzueta**

Santander, Septiembre 2014

**Este proyecto ha sido subvencionado por el Fondo del Grupo consolidado IDIVAL de Enfermedades Cardiovasculares, Señalización Hormonal y Trastornos Metabólicos.**



Facultad de Medicina

Departamento de Medicina y Psiquiatría

DÑA. MARÍA DEL CARMEN FARIÑAS ÁLVAREZ, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y PSIQUIATRÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA Y JEFE DE SECCIÓN DEL SERVICIO DE MEDICINA INTERNA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA DE SANTANDER

CERTIFICA que la presente Tesis Doctoral titulada **ESTADO NUTRICIONAL EN VITAMINA D Y PÉPTIDOS ANTIBIÓTICOS VITAMINA D DEPENDIENTES (CATELICIDINA Y  $\beta$ -2-DEFENSINA) EN SANGRE Y LÍQUIDO PLEURAL: POSIBLES IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS Y DIAGNÓSTICAS EN LOS DERRAMES PLEURALES**, realizada bajo mi dirección por **Don Carlos Antonio Amado Diago**, responde a las exigencias científicas de originalidad y rigor propias de un trabajo de esta índole y son fruto de la capacidad técnica e interpretativa del doctorando.

Santander, Septiembre de 2014.

Edificio de la Escuela de Enfermería, Av. Valdecilla s/n, 39008, Santander



Facultad de Medicina

Departamento de Medicina y Psiquiatría

DÑA. MARÍA TERESA GARCÍA UNZUETA, DOCTORA EN MEDICINA Y FACULTATIVA ESPECIALISTA DE ÁREA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA DE SANTANDER

CERTIFICA que la presente TESIS DOCTORAL titulada **ESTADO NUTRICIONAL EN VITAMINA D Y PÉPTIDOS ANTIBIÓTICOS VITAMINA D DEPENDIENTES (CATELICIDINA Y  $\beta$ -2-DEFENSINA) EN SANGRE Y LÍQUIDO PLEURAL: POSIBLES IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS Y DIAGNÓSTICAS EN LOS DERRAMES PLEURALES**, realizada bajo mi dirección por **Don Carlos Amado Diago**, responde a las exigencias científicas de originalidad y rigor propias de un trabajo de esta índole y son fruto de la capacidad técnica e interpretativa del doctorando.

Santander, Septiembre de 2014.

Edificio de la Escuela de Enfermería, Av. Valdecilla s/n, 39008, Santander

**“Sol maximum remediorum est”**

**Plinio el Viejo Historia Natural Libro XXVIII cap 55**

Al Doctor Daniel García Palomo, un ejemplo para todos los médicos e investigadores de este hospital, siempre te recordaremos.

A mis padres, que también han sido mis maestros en tantos campos de mi vida.

A Mila, que siempre ha sabido apoyarme.

Este trabajo es el resultado de la colaboración decidida y la ayuda desinteresada de muchas personas, a ellas expreso mi agradecimiento.

A las Doctoras Fariñas y García Unzueta, mis directoras de tesis.

A Pedro Muñoz

A María Francisca Santos

A María Ortiz

A Blanca Paule

A Javier Villuela

## ÍNDICE

---

1. Introducción.....	1
1.1 El derrame pleural.....	2
1.1.1 Fisiología del líquido pleural.....	2
1.1.1.1 Mecanismos de entrada de líquido a la cavidad pleural.....	2
1.1.1.2 Mecanismos de reabsorción de líquido de la cavidad pleural.....	6
1.1.2 Etiopatogenia del derrame pleural.....	7
1.1.2.1 Derrame pleural por aumento de entrada de líquido.....	7
1.1.2.2 Derrame pleural por disminución de reabsorción de líquido.....	8
1.1.3 Tipos de derrame pleural.....	9
1.1.3.1 Derrame pleural tipo trasudado.....	14
1.1.3.1.1 Derrame pleural cardiaco.....	14
1.1.3.1.2 Otros derrames pleurales tipo trasudado.....	16
1.1.3.2 Derrame pleural tipo exudado.....	16
1.1.3.2.1 Derrame pleural paraneumónico.....	16
1.1.3.2.2 Derrame pleural tuberculoso.....	19
1.1.3.2.3 Derrame pleural tumoral.....	23
1.1.3.2.4 Otros derrames pleurales tipo exudado....	29
1.1.4 Biomarcadores pleurales.....	30
1.2 La vitamina D y las enfermedades pleuro-pulmonares.....	46
1.2.1 Aspectos generales de la vitamina D.....	46
1.2.2 Papel de la Vitamina D en el sistema inmunológico.....	55

1.2.3 Antibióticos humanos Vitamina D dependientes.....	59
1.2.3.1 La Catelicidina Humana o LL-37.....	60
1.2.3.2 Las defensinas: $\beta$ -Defensina 2 o h $\beta$ D2.....	68
1.2.4 Deficiencia de vitamina D y enfermedades pulmonares.....	71
2. Hipótesis.....	74
3. Objetivos.....	76
3.1 Objetivo general.....	77
3.2 Objetivos específicos.....	77
4. Material y métodos.....	79
4.1 Diseño del estudio.....	80
4.2 Pacientes.....	80
4.2.1 Ámbito del estudio.....	80
4.2.2 Criterios de inclusión y exclusión.....	80
4.2.3 Pacientes y muestras.....	81
4.2.4 Clasificación de los líquidos pleurales.....	82
4.2.5 Procedimiento de confidencialidad.....	83
4.3 Determinaciones analíticas específicas en suero y líquido pleural....	83
4.3.1 25 OH vitamina D.....	84
4.3.2 1,25 (OH) <sub>2</sub> vitamina D.....	85
4.3.3 VDBP.....	85
4.3.4 Catelicidina o LL-37.....	86
4.3.5 $\beta$ -2-defensina.....	87
4.4 Pruebas analíticas generales en sangre y líquido pleural.....	87
4.5 Análisis citológico y microbiológico del líquido pleural.....	88
4.6 Rastreo bibliográfico.....	88
4.7 Procesamiento de datos y análisis estadístico.....	88
5. Resultados.....	90
5.1 Población incluida en el estudio.....	91

5.2 Estado nutricional en vitamina D en los pacientes con derrame pleural.....	93
5.2.1 Alta prevalencia de hipovitaminosis D en pacientes con derrame pleural.....	93
5.2.2 Prevalencia de hipovitaminosis D en pacientes con derrame pleural comparados con sujetos sanos emparejados por edad, zona geográfica y época del año.....	93
5.2.3 Hipovitaminosis D según la causa del derrame pleural.....	94
5.2.4 Influencia de la edad sobre los niveles de 25 OH vitamina D en los derrames pleurales.....	97
5.2.5 Influencia de la estacionalidad sobre los niveles de 25 OH vitamina D en los derrames pleurales.....	101
5.2.6 Hipovitaminosis D según el derrame sea exudado o trasudado.....	102
5.3 Metabolitos de la Vitamina D y VDBP en suero y líquido pleural en los pacientes con derrames pleurales.....	103
5.3.1 Según la causa de derrame pleural.....	103
5.3.2 Según el derrame pleural infeccioso sea complicado o no complicado.....	112
5.3.3 Según el derrame sea exudado o trasudado.....	114
5.4 Péptidos antibióticos vitamina D dependientes en Sangre y líquido pleural en los pacientes con derrame pleural.....	118
5.4.1. Comparación de catelicidina en suero en pacientes con derrame pleural comparada con la de sujetos sanos emparejados por edad, zona geográfica y época del año.....	118
5.4.2 Según la causa de derrame pleural.....	118
5.4.3 Según el derrame pleural infeccioso sea complicado o no complicado.....	125
5.4.4 Según el derrame sea exudado o trasudado.....	127
5.5 Correlaciones entre los distintos parámetros.....	130

5.5.1 En el grupo total de derrames pleurales (DPI + DPC + DPT).....	130
5.5.2 En los derrames pleurales infecciosos.....	132
5.6 Curvas Característica Operativa del Receptor e los distintos parámetros relacionados con la vitamina D.....	133
5.6.1 Utilidad para diferenciar los distintos grupos etiológicos...133	
5.6.2 Utilidad para diferenciar exudados y trasudados.....	136
5.6.3 Utilidad para diferenciar derrames complicados y no complicados.....	141
6. Discusión.....	144
7. Conclusiones.....	157
8. Bibliografía.....	160
9. Anexos (Índice de Tablas, CEIUC, etc)... ..	189

## ABREVIATURAS

---

Ac	Anticuerpo
ADA	Adenosina Deaminasa
AUC	<i>Area under the curve</i> (Área bajo la curva)
AR	Artritis Reumatoide
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BNP	<i>Brain natriuretic peptide o B-type natriuretic peptide</i> (Péptido natriurético cerebral o tipo B)
BTS	<i>British Thoracic Society</i>
CA	<i>Cancer antigen</i>
CDC	<i>Center for Diseases Control</i> de EE UU
COR	(Curva) Característica operativa del receptor, en inglés ROC
CYFRA	<i>Cytokeratin fragment</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Derrame pleural
DPC	Derrame pleural de causa cardiaca
DPI	Derrame pleural de causa infecciosa
DPT	Derrame pleural de causa tumoral
DPTb	Derrame pleural tuberculoso
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorvent Assay</i> (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
IGRA	<i>Interferon gamma release assays</i> (Ensayos de liberación de interferón-gamma)
hBD2	$\beta$ -2-defensina humana
ICC	Insuficiencia Cardíaca Congestiva
II	Interleuquina
IMC	Índice de masa corporal
IOM	<i>Institute of Medicine</i> (Instituto de Medicina de EE UU)

KCO	Difusión de monóxido de carbono corregida por volumen alveolar
LDH	Lactato Deshidrogenasa
LL-37	<i>Leucin-leucin 37</i> (Péptido de 37 aminoácidos iniciado con leucina-leucina) o Catelicidina
LPS	Lipopolisacárido
LP	Líquido Pleural
LP/S	(Concentración de sustancia en) Líquido pleural dividido entre (concentración de sustancia en) suero
MM	Metaloproteinasas de matriz
NIH	<i>National Institutes of Health</i> (Institutos Nacionales de la Salud de EE UU)
NT-proBNP	<i>Aminoterminal proBrain natriuretic peptide</i> (Fracción aminoterminal del propéptido natriurético tipo B)
PCR	Proteína C reactiva
PPD	<i>Purified proteic derivative</i> (Derivado proteico purificado de <i>M tuberculosis</i> )
RIA	<i>Radioimmunoassay</i> (Radioinmunoensayo)
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	<i>Receiver operating characteristics (curve)</i>
RPC	Reacción de polimerasa en cadena (las siglas PCR no se utilizan para evitar confusión con la Proteína C reactiva)
SNP	<i>Single nucleotide polymorphisms</i> (Polimorfismos de un único nucleótido)
TAC	Tomografía Axial Computerizada
TEP	Tromboembolismo pulmonar
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (Receptor similar al receptor <i>Toll</i> )
VATS	Videotoracoscopía
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VDBP	<i>Vitamin D binding protein</i> (Proteína transportadora de la vitamina D)
VDR	<i>Vitamin D receptor</i> (Receptor del calcitriol)

VEGF      *Vascular Endothelial Growth Factor* (Factor de crecimiento del endotelio vascular)

VSG      Velocidad de sedimentación globular

1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D      1,25-dihidroxitamina D o calcitriol

25OH vitamina D      25-hidroxitamina D o calcifediol

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. EL DERRAME PLEURAL**

La pleura está formada por dos membranas constituidas principalmente por células mesoteliales, separadas por un espacio real de 10-20  $\mu\text{m}$ . Las células mesoteliales pleurales tienen múltiples funciones. Además de la producción de tejido conectivo submesotelial guardan relación con la inflamación, habiéndose demostrado que tienen actividad fagocítica *in vitro* y que son capaces de secretar distintas sustancias inmunomoduladoras y quimiotácticas (Wang *et al* 1998).

La pequeña cantidad de líquido que se acumula en condiciones fisiológicas en la cavidad pleural permite que los pulmones se hinchen y se deshinchén con una fricción mínima al hacer los movimientos respiratorios. Este líquido pleural (LP) puede llegar desde el intersticio pulmonar, los capilares pleurales, los conductos linfáticos intratorácicos, las venas intratorácicas o la cavidad peritoneal y se reabsorbe fundamentalmente gracias al sistema linfático. En condiciones normales hay un estrecho equilibrio entre la formación y la absorción del LP (Akulian *et al* 2013). El derrame pleural se produce cuando entra más líquido en la cavidad pleural de lo que el sistema linfático es capaz de reabsorber (Miserocchi *et al* 2009).

Recientemente se han publicado dos excelentes monografías sobre las enfermedades pleurales en *Disease a month* (2013) y *Clinics in Chest Medicine* (2013), ambas lideradas por Light y Porcel.

### **1.1.1. FISIOLÓGÍA DEL LÍQUIDO PLEURAL**

#### **1.1.1.1. Mecanismos de entrada de líquido a la cavidad pleural:**

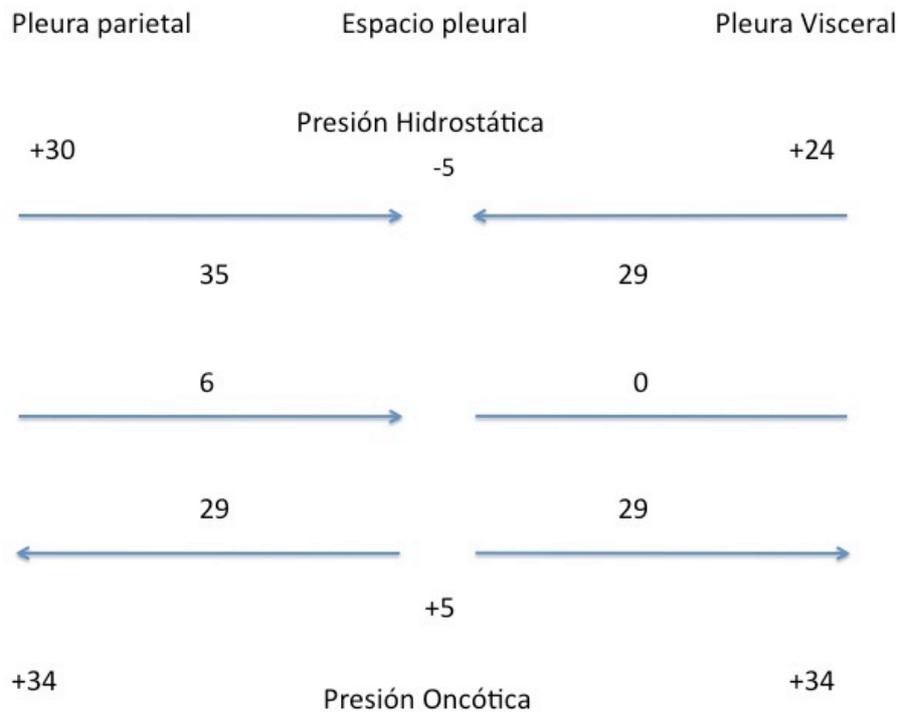
Entrada de líquido procedente del espacio intersticial pulmonar: Tanto un aumento de presión en los capilares pulmonares como un aumento en la permeabilidad de los mismos pueden llevar a la acumulación de líquido en el

espacio pleural. Varios estudios realizados en ovejas han demostrado que ante una sobrecarga de volumen, se produce un aumento del contenido en líquido en el espacio pleural, y que este fenómeno ocurre únicamente tras la aparición de un edema pulmonar (Broaddus *et al* 1990, Allen *et al* 1989).

Entrada de líquido procedente de los capilares pleurales: La entrada de líquido de los capilares pleurales al espacio pleural se produce siguiendo la Ley de Starling de intercambio transcapilar (Parameswaran *et al* 1999). Esta ley aplicada al espacio pleural viene definida por la ecuación siguiente:  $Q_f = L_p \times A \times [(P_{cap} - P_{pl}) - \sigma_d \times (\pi_{cap} - \pi_{pl})]$ , donde  $Q_f$  es el flujo de líquido;  $L_p$  es el coeficiente de filtración/área o la conductividad hidráulica de agua de la membrana;  $A$  es el área de la membrana;  $P$  y  $\pi$  son la presión hidrostática y oncótica respectivamente del espacio intracapilar (cap) y el espacio intrapleural (pl);  $\sigma_d$  es el coeficiente de reflexión para solutos (en este caso, fundamentalmente para proteínas), que da una medida de la capacidad para que pasen moléculas grandes a través de la membrana (Lai-Fook *et al* 2004). Existe una gran variabilidad del factor  $\sigma_d$  entre los distintos animales. Por ejemplo en el perro, este valor excede 0,8 (Lai-Fook *et al* 2004), indicando una marcada restricción de movimiento de moléculas grandes como la albúmina. Sin embargo, en el cerdo, el valor de  $\sigma_d$  es de 0,02, lo que implica una escasa restricción al paso de moléculas grandes (Lai-Fook *et al* 2004). Parece que en lo que respecta a la entrada de líquido en la pleura, el valor de  $\sigma_d$  se encuentra más relacionado con las características del endotelio que con las características de la barrera pleural.

Los valores estimados de las presiones que afectan al movimiento de fluidos a través de los capilares al espacio pleural se muestran en la figura 1.1.

Figura 1.1. Presiones del espacio pleural.



En condiciones fisiológicas existe siempre un gradiente a favor de la formación de LP a través de la pleura parietal. La presión hidrostática en la pleura parietal es de aproximadamente 30 cm H<sub>2</sub>O, mientras que la presión pleural es de aproximadamente -5cm H<sub>2</sub>O. La presión hidrostática neta es, por lo tanto, de  $30 + 5 = 35$  cm H<sub>2</sub>O lo que favorece el movimiento de fluidos a través de la pleura parietal al espacio pleural. Opuesto al gradiente de presión hidrostática, se encuentra el gradiente de presión oncótica. La presión oncótica en el plasma es de aproximadamente 34 cm H<sub>2</sub>O. El líquido pleural fisiológico tiene unos niveles bajos de proteínas, siendo su presión oncótica de 5 cm H<sub>2</sub>O (Miserocchi *et al* 1971), lo que establece un gradiente neto de presión oncótica de 29 cm H<sub>2</sub>O. Por lo tanto, el gradiente neto de presiones hidrostática y oncótica es de  $35 - 29 = 6$  cm H<sub>2</sub>O, lo que favorece el paso de fluido de líquido de los capilares al espacio pleural.

Se cree que el flujo de líquido a través de la pleura visceral es próximo a 0, pero esto no se ha demostrado. La presión hidrostática en los capilares de la pleura visceral es 6 cm H<sub>2</sub>O menor que en la pleura parietal porque los capilares de la pleura visceral drenan a la circulación pulmonar. Este es el único factor que varía en relación con la ley de Starling de intercambio transcápilar por lo que se puede deducir que el gradiente neto de presiones es próximo a 0. También parece que el L<sub>p</sub> de la pleura visceral es sustancialmente menor que el de la pleura parietal porque los capilares en la pleura visceral se encuentran más alejados del espacio pleural que los capilares de la pleura parietal (Albertine *et al* 1984).

La formación de LP parece variar a lo largo de la pleura parietal, produciéndose más en la pleura parietal que está en contacto con las costillas, que en la que ocupa el espacio intercostal y en el área caudal más que en el área craneal (Wang *et al* 1999).

Entrada de líquido procedente de la cavidad peritoneal: Se puede producir si hay líquido libre en la cavidad peritoneal, y aperturas en el diafragma. Si se cumplen estos requisitos se producirá un paso de líquido de la cavidad peritoneal a la pleural dado que la presión en la cavidad pleural es menor. La formación de derrame pleural por alteraciones en la cavidad peritoneal es el principal mecanismo por el que se produce derrame en enfermedades como el hidrotórax, el síndrome de Meigs y la diálisis peritoneal.

Entrada de líquido por rotura del conducto torácico o de grandes vasos: Si se produce una rotura en el conducto torácico, la linfa se acumula en el espacio pleural, originando un quilotórax. Lo mismo ocurre en el caso de los grandes vasos. Si debido a un traumatismo o una enfermedad, se produce la rotura de uno de los grandes vasos, la sangre se acumula de manera inmediata en la cavidad pleural.

Se cree que el líquido que se encuentra en condiciones fisiológicas en el espacio pleural se produce por la filtración a través de la pleura parietal (Nahid *et al* 2003), a una velocidad aproximada de 0,01-0,02 ml/Kg/hora en modelos

animales. Si se extrapolan estos resultados a un ser humano de 50 Kg la formación de líquido sería de aproximadamente 15 ml al día (Nahid *et al* 2003).

#### **1.1.1.2. Mecanismos de reabsorción de líquido de la cavidad pleural**

Absorción linfática: El espacio pleural se comunica con la red linfática a través de estomas en la pleura parietal. Los estomas se encargan del drenaje de células, proteínas, agua y otros productos (Cooray 1949). A través de cálculos realizados en modelos animales, se estima que la cantidad de fluido que puede ser absorbido a través del sistema linfático es aproximadamente 0,22-0,4 ml/Kg/hora, lo que extrapolado a un humano de 60 Kg constituye un drenaje de 20 ml/hora (500 ml al día) (Stewart 1963).

Absorción a través de los capilares de la pleura visceral: Hasta mediados de los años 80 se creía que el principal mecanismo de absorción del LP era la absorción a través de los capilares de ciertas regiones de la pleura visceral. Hoy en día se considera que este mecanismo juega un papel poco importante en la absorción del LP y que se ve limitado a la absorción de agua y moléculas de pequeño tamaño (Pistolesi *et al* 1989).

Otros mecanismos, como la transcitosis (un conjunto de procesos que permiten el paso de macromoléculas desde un espacio extracelular a otro, mediante la formación de vesículas) (Berk *et al* 2006), podrían jugar un papel en la absorción de ciertos componentes del LP (Agostini *et al* 2002).

En condiciones fisiológicas, por tanto, la reabsorción de LP a través de los linfáticos pleurales excede con mucho la capacidad de formación de líquido.

### 1.1.2. ETIOPATOGENIA DEL DERRAME PLEURAL (DP)

La etiopatogenia de los diferentes tipos de DP se presenta en la tabla 1.1.

Tabla 1.1 Causas y mecanismos de producción de derrame pleural

<p><b>Aumento de formación de líquido pleural</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>Aumento del líquido intersticial pulmonar<ul style="list-style-type: none"><li>Fallo ventricular izquierdo, neumonía, embolia pulmonar</li></ul></li><li>Aumento de presión intravascular capilar en la pleura<ul style="list-style-type: none"><li>Fallo ventricular, síndrome de vena cava superior</li></ul></li><li>Aumento de la permeabilidad capilar pleural<ul style="list-style-type: none"><li>Inflamación pleural</li><li>Aumento de <i>Vascular endothelial growth factor</i> (VEGF)</li></ul></li><li>Aumento de la concentración de proteínas en el líquido pleural</li><li>Disminución de la presión pleural<ul style="list-style-type: none"><li>Atelectasias pulmonares</li></ul></li><li>Aumento de líquido en la cavidad peritoneal<ul style="list-style-type: none"><li>Ascitis o diálisis peritoneal</li></ul></li><li>Rotura del conducto torácico</li><li>Rotura de los grandes vasos</li></ul> <p><b>Disminución de la absorción de líquido pleural</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>Obstrucción del sistema linfático</li><li>Elevación de las presiones vasculares sistémicas<ul style="list-style-type: none"><li>Síndrome de vena cava superior o fallo ventricular derecho</li></ul></li></ul>
--

#### 1.1.2.1. Derrame pleural por aumento de entrada de líquido:

Aumento del líquido intersticial pulmonar: Es la causa más frecuente de derrame pleural por aumento de formación. Cuando la cantidad de edema en el pulmón excede los 5 g/g g/g de peso seco pulmonar el LP se acumula

independientemente de si el líquido acumulado contiene un número de proteínas alto o bajo (Wiener-Kronish *et al* 1993). Este parece el mecanismo fundamental para la formación de DP en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva (ICC), derrames paraneumónicos, síndrome de distress respiratorio, y en pacientes con derrame relacionado con el trasplante de pulmón.

Aumento del gradiente de presión hidrostática: Un aumento en el gradiente de presión hidrostática, según la ecuación de Starling, elevará la producción de LP. El aumento de presión hidrostática vascular puede ocurrir en el fallo ventricular derecho o izquierdo, en los derrames pericárdicos, o en el síndrome de vena cava superior. La causa más común de disminución de presión hidrostática intrapleural que puede llevar a la formación de derrame pleural es la formación de una atelectasia en el lóbulo inferior por obstrucción bronquial, y en el pulmón atrapado (Light *et al* 1980).

Aumento de la permeabilidad capilar: El aumento en los niveles de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) que se produce en determinadas circunstancias como los derrames pleurales paraneumónicos, podría tener también su papel en la formación de derrames pleurales mediante su efecto sobre la permeabilidad capilar (Cheng *et al* 1999).

Disminución en el gradiente de presión oncótica: Este mecanismo se puede producir en el edema pulmonar, hemotórax, o por la hipoproteinemia (Eid *et al* 1999).

Otros mecanismos: También es posible la formación de LP a través del flujo de líquido peritoneal o la rotura del conducto torácico o los grandes vasos.

#### **1.1.2.2. Derrame pleural por disminución de la reabsorción de líquido:**

Obstrucción del sistema linfático: Se trata del mecanismo más común de desarrollo de derrame pleural por disminución en la absorción. Se produce típicamente en los derrames pleurales de etiología tumoral (Leckie *et al* 1965).

A no ser que la obstrucción linfática sea muy importante debe haber otro factor además de éste, que favorezca la creación del derrame pleural.

Elevación de las presiones venosas sistémicas: Dado que el sistema linfático drena en la circulación venosa sistémica, un aumento en la presión venosa central disminuye el flujo linfático. Este mecanismo puede ser la causa del derrame pleural en los casos de Síndrome de vena cava superior.

### **1.1.3. TIPOS DE DERRAME PLEURAL**

Los derrames pleurales se clasifican tradicionalmente en trasudado y exudado (Tabla 1.2). Un trasudado es un LP que se forma cuando se ven alterados factores sistémicos que influyen en la formación y absorción del líquido pleural, lo que favorece su acúmulo en la pleura (Agostini *et al* 1957). El ejemplo más típico de trasudado es el derrame pleural secundario a insuficiencia cardíaca congestiva. Un exudado es un LP que se forma debido a la inflamación u otro tipo de enfermedad que afecta de forma directa a la superficie pleural, como es el caso del derrame pleural maligno o del empiema (Light *et al* 1972).

La clasificación de los DP en trasudado o exudado es un paso inicial muy importante para el diagnóstico diferencial y el posterior manejo del derrame, ya que en función de esta clasificación se deben buscar causas sistémicas (como la insuficiencia cardíaca) o locales (como el empiema). Clásicamente, un derrame pleural con una cantidad de proteínas totales de 30 g/l se considera un exudado, mientras que un derrame pleural con un número de proteínas inferior a 30 g/l es un trasudado. Esta clasificación deja de ser útil si la cantidad de proteínas en suero no entra dentro del rango normal, o cuando su concentración en el líquido es próxima a 30 g/l (cosa que es muy frecuente), por lo que se recomienda el uso de los criterios de Light de forma rutinaria (Light *et al* 1972). Para que un líquido sea considerado un exudado por los criterios de Light, debe cumplir al menos uno de los siguientes postulados:

- La Ratio proteínas en líquido pleural/proteínas en suero es  $>0,5$
- La Ratio de Lactato Deshidrogenasa (LDH) en líquido pleural/LDH en suero es  $>0,6$
- La LDH en líquido pleural es  $>2/3$  de lo considerado en el laboratorio como límite alto de la normalidad.

Se han comparado diferentes fórmulas y biomarcadores con los criterios de Light, pero, con su sensibilidad de 97,9% [95% IC 96,9 a 98,9%]; y especificidad de 74,3% [95% IC 68,9 a 79,7%] continúa siendo un método de referencia.

Un intervalo de tiempo menor a 28 horas entre la obtención del LP y el suero parece no afectar la utilidad de los criterios de Light, según el estudio de Jenkinson *et al* (2007).

Uno de los problemas de los criterios de Light es que, clasifican como exudados aproximadamente un 15-20% de derrames de pacientes con insuficiencia cardíaca o cirrosis. En los derrames pleurales de pacientes que han sido tratados con diuréticos, se produce un aumento de la concentración de proteínas, LDH, y lípidos. En este contexto, los criterios de Light clasifican una importante cantidad de líquidos de tipo trasudado como exudados. En estos casos, se debe calcular el gradiente entre proteínas séricas y proteínas pleurales. Si este gradiente es mayor a 3,1 g/dl el paciente se considera que tiene un DP tipo trasudado (Romero-Candeira *et al* 2001). El fracción N - terminal del *pro Brain Natriuretic Peptide* (NT-proBNP) también ha sido utilizado en este contexto. Otras técnicas, como la ratio de albúmina o el gradiente de albúmina también se han utilizado en estos casos, siendo este tipo de pruebas mucho más efectivas en los DP de etiología cardíaca que en los de etiología hepática (Bielsa *et al* 2012).

Existen otros métodos para tratar de diferenciar entre trasudado y exudado. Un meta-análisis de siete estudios (1448 pacientes) evaluó distintas pruebas analíticas realizadas en el LP y encontró que varias pueden identificar exudados con una exactitud similar a la de los criterios de Light, pero sin requerir la medición simultánea en suero de proteínas o LDH (Heffner *et al*

1997). Es el caso de la regla de las 2 pruebas (*two test rule*), y de la regla de las 3 pruebas (*three test rule*), que requieren cumplir un criterio de los siguientes para definir un exudado:

Regla de las 2 pruebas: los LP que cumplan uno de los 2 criterios siguientes se consideran exudados, con una sensibilidad de 97,5% [95% IC 96,4 a 98,6%] y una especificidad de 70,9% [95% IC 66,4 a 77,5%]:

- Colesterol en LP 45 mg/dl
- LDH en LP mayor de 0,45 veces el límite superior de la LDH en sangre del laboratorio

Regla de las 3 pruebas: los LP que cumplan uno de estos 3 criterios serán considerados exudados; sensibilidad de 98,4% [95% IC 97,5 a 99,3%]; especificidad de 70,4% [95% IC 64,7 a 76,0%]

- Proteínas en LP mayores de 2,9 g/dl
- Colesterol en LP mayor de 45 mg/dl
- LDH en LP mayor de 0,45 veces el límite superior de la LDH en sangre del laboratorio

También se han propuesto otros marcadores para definir los exudados y trasudados, como el colesterol o la bilirrubina solos en el LP o el gradiente de albúmina suero-líquido pleural. El cociente de colesterol en líquido pleural / Suero parece tener una gran utilidad diagnóstica por si solo (Wilcox *et al* 2014). Todos ellos tienen una alta sensibilidad a expensas de una menor especificidad, siendo de especial interés el gradiente de albúmina. Sin embargo, estas pruebas no se suelen realizar de forma rutinaria para la diferenciación entre trasudado y exudado, ya que se siguen utilizando los criterios de Light en la práctica habitual.

Todas estas pruebas disponibles pueden clasificar mal los tipos de líquido pleural cuando los valores del parámetro medido están cerca del punto de corte (Light *et al* 1972), por lo que en estos casos es especialmente importante el criterio clínico.

Tabla 1.2. Tipos de derrame pleural

**I. Derrames pleurales tipo trasudado**

- A. Insuficiencia cardiaca congestiva
- B. Cirrosis
- C. Síndrome nefrótico
- D. Síndrome de vena cava
- E. Procedimiento de Fontan
- F. Urinotórax
- G. Diálisis peritoneal
- H. Glomerulonefritis
- I. Mixedema
- J. Hipoalbuminemia
- K. Sarcoidosis
- L. Fuga de líquido cefaloraquídeo a pleura

**II. Derrames tipo exudado**

- A. Malignos
  - 1. Enfermedad metastásica
  - 2. Mesotelioma
  - 3. Linfoma de cavidades
  - 4. Linfoma asociado a piotórax
- B. Infecciosos
  - 1. Infección Bacteriana
  - 2. Tuberculosis
  - 3. Infección Fúngica
  - 4. Infección por parásitos
  - 5. Infección Vírica
- C. Tromboembolismo pulmonar
- D. Enfermedad gastrointestinal
  - 1. Enfermedades pancreáticas
  - 2. Absceso subfrénico
  - 3. Absceso intrahepático
  - 4. Absceso intraesplénico
  - 5. Perforación esofágica
  - 6. Cirugía Abdominal
  - 7. Hernia Diafragmática
  - 8. Esclerosis endoscópica de varices
  - 9. Post-trasplante hepático
- E. Enfermedades del corazón
  - 1. Post-cirugía de by-pass de arterias coronarias
  - 2. Síndrome de Dressler
  - 3. Enfermedad pericárdica
  - 4. Estenosis de vena pulmonar tras ablación de fibrilación auricular
- F. Enfermedades ginecológicas y obstétricas
  - 1. Síndrome de hiperestimulación ovárica
  - 2. Derrame pleural fetal
  - 3. Derrame pleural postparto

**(Tabla 1.2. Tipos de derrame pleural. Continuación)**

4. Síndrome de Meigs

5. Endometriosis

G. Colagenosis y Vasculitis

1. Artritis reumatoide
2. Lupus eritematoso sistémico
3. Lupus inducido por fármacos
4. Linfadenopatía inmunoblástica
5. Síndrome de Sjögren
6. Fiebre mediterránea familiar
7. Síndrome de Churg-Strauss
8. Granulomatosis de Wegener

H. Enfermedad pleural inducida por fármacos

1. Nitrofurantoína
2. Dantroleno
3. Metisergida
4. Drogas ergotamínicas
5. Amiodarona
6. Interleuquina 2
7. Procarbazina
8. Metotrexato
9. Clozapina

I. Miscelánea

1. Exposición a asbesto
2. Post-trasplante de pulmón
3. Post-trasplante de médula ósea
4. Sarcoidosis
5. Uremia
6. Pulmón atrapado
7. Post-radioterapia
8. Ahogamiento
9. Amiloidosis
10. Quemaduras eléctricas
11. Hemopoyesis extramedular
12. Rotura de quiste mediastínico
13. Síndrome de distress respiratorio agudo
14. Iatrogénico
15. Enfermedad de Whipple

J. Hemotórax

K. Quilotórax

### **1.1.3.1. Derrame pleural tipo trasudado**

#### **1.1.3.1.1. Derrame pleural cardiaco (DPC)**

Es probablemente la causa más frecuente de derrame pleural (Marel *et al* 1993). Como se ha comentado, las teorías actuales proponen que la mayor parte del líquido que entra en el espacio pleural en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva proviene de los capilares alveolares en vez de los capilares pleurales, y llega al espacio pleural a través de la pleura visceral. En este contexto, además, el sistema linfático, no es capaz de retirar el líquido pleural acumulado por el aumento de las presiones venosas sistémicas (Wiener-Kronish *et al* 1993). Los pacientes con DPC presentan los síntomas típicos de la insuficiencia cardiaca: edema periférico y aumento de la disnea, ortopnea o disnea paroxística nocturna. En este tipo de derrames, la radiografía de tórax resulta fundamental, visualizándose cardiomegalia y normalmente, derrame pleural bilateral. Inicialmente se pensaba que los derrames pleurales debidos a insuficiencia cardiaca eran en alta proporción derechos, o de una cantidad mayor en el lado derecho que en el lado izquierdo, sin embargo, en diversos estudios en los que se incluye 444 pacientes (Porcel *et al* 2006), se ha demostrado que hasta el 69% de los DPC son bilaterales, el 21% son unilaterales en el lado derecho, y 9% son unilaterales en el lado izquierdo. De los bilaterales, la mayor parte tenían un tamaño similar, pero cualquiera de los dos lados podía ser estar más afectado.

Ante un derrame pleural en un paciente sin dolor de características pleuríticas, afebril, con datos de insuficiencia cardiaca y un derrame pleural bilateral, las guías clínicas recomiendan una actitud conservadora (Marel *et al* 1993). Si el DP no desaparece tras iniciar el tratamiento diurético, en estos casos se recomienda realizar una toracocentesis diagnóstica.

El problema de esta forma de tratar los derrames pleurales, es que el tratamiento diurético puede elevar los niveles de LDH y proteínas, tal y como se explica en el apartado 1.2.4, lo que puede originar la clasificación errónea de estos de derrames como exudado. Por ello, el líquido pleural del 15-20% de los

pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva será clasificado como exudado por los criterios de Light (Burgess *et al* 1995). Si el LP cumple criterios de exudado, pero el derrame parece ser de origen cardiaco por criterios clínicos, se debe valorar el gradiente de proteínas. Si este gradiente es mayor de 3,1 g/dl, el derrame se debe probablemente a insuficiencia cardiaca y no se necesitan más estudios (Romero-Candeira *et al* 2001). En pacientes en tratamiento diurético, el gradiente de proteínas no varía mucho con la diuresis (Romero-Candeira *et al* 2001). Si un DP no cumple los criterios de Light, pero tiene un gradiente de proteínas inferior a 3,1 g/dl, el derrame pleural probablemente se debe a un exudado, y se requieren más pruebas diagnósticas. Aunque el gradiente de albúmina se ha utilizado con anterioridad para diferenciar los exudados de los trasudados, actualmente se considera más coste-efectivo utilizar únicamente el gradiente de proteínas, ya que los valores necesarios para su cálculo se suelen obtener de forma rutinaria para el cálculo de los criterios de Light, y parecen tener una rentabilidad diagnóstica similar (Romero-Candeira *et al* 2001).

La utilidad de otros biomarcadores para diferenciar el derrame pleural de origen cardiaco del de otros tipos de derrames, como el NT-pro-BNP se comenta más adelante.

El manejo de este tipo de derrames consiste en tratar la insuficiencia cardiaca mediante inotrópicos, diuréticos y disminuir la poscarga. Si se trata de forma adecuada, el DP desaparece. En ocasiones, los DP grandes pueden provocar disnea grave. La evacuación de 500-1000 ml de líquido pleural puede aliviar rápidamente esta disnea. En los pacientes con insuficiencia cardiaca y derrames pleurales refractarios al tratamiento, a veces, se consigue un importante alivio sintomático mediante la realización de una toracocentesis terapéutica. En estos casos también se deben considerar intervenciones más agresivas para controlar el derrame, por ejemplo realizar una pleurodesis con un agente esclerosante como la doxiciclina (Glazer *et al* 2000). Otra posibilidad es la colocación de un catéter pleural subcutáneo o crear un shunt pleuroperitoneal (Little AG *et al* 1988).

### **1.1.3.1.2. Otros derrames pleurales tipo trasudado**

Se incluyen aquí otros derrames tipo trasudado menos frecuentes como son los de causa hepática (cirrosis), los secundarios a síndrome nefrótico, los debidos a la diálisis peritoneal, o los secundarios a trombosis venosa suprahepática.

### **1.1.3.2. Derrame pleural tipo exudado**

#### **1.1.3.2.1. Derrame pleural paraneumónico**

La neumonía sigue siendo hoy una de las enfermedades más relevantes en todo el mundo. Su incidencia aproximada en Estados Unidos es de alrededor de 4 millones de pacientes al año, de los cuales precisan ser ingresados aproximadamente el 25% (Halm *et al* 2002). Dentro de ellos cerca del 40% presentan un DP (Light *et al* 2000).

Dentro de los DP de etiología infecciosa el término derrame paraneumónico se aplica a cualquier derrame que aparezca en el contexto de una neumonía, de una infección respiratoria en un paciente con bronquiectasias, o en un paciente con un absceso pulmonar.

Un empiema es un DP formado por pus. Esta definición puede resultar problemática, ya que requiere la definición exacta de cuantas células blancas debe haber en el espacio pleural para considerar un derrame como un empiema. En este sentido, autores como Weese *et al* 1973 definieron empiema como un LP con una densidad superior a 1018, con más de 500 células/mm<sup>3</sup> o con un nivel de proteínas por encima de 3 g/dl.

Por motivos prácticos, algunos autores (Light *et al* 2007), acuñaron el término derrame pleural paraneumónico complicado para denominar a los derrames pleurales que requieren la colocación de un tubo de tórax para su resolución, independientemente de que cumplan los criterios para ser considerados empiema o no.

La formación del derrame pleural paraneumónico, pasa por tres fases bien definidas. La primera fase, o fase exudativa, consiste en la acumulación de líquido estéril en la cavidad pleural. El proceso por el que se produce este tipo de derrame es poco conocido y probablemente varíe en función de la etiología que lo produzca. Se han propuesto varios mecanismos, como el paso de líquido desde el espacio intersticial a la cavidad pleural, o un aumento de la permeabilidad de los capilares pleurales durante la infección pulmonar (Wiener-Kronish *et al* 1993). Durante esta fase el análisis del líquido pleural, demostrará la presencia de niveles normales de glucosa y de LDH y escasa celularidad. En este periodo, el derrame se puede resolver si se trata al paciente con antibioterapia sistémica. Si el proceso sigue avanzando se desarrolla la fase fibropurulenta, en la que pueden pasar bacterias al espacio pleural. Esta fase se caracteriza por un acúmulo de células inflamatorias en el espacio pleural, apreciándose en el estudio anatomopatológico la presencia de numerosos polimorfonucleares, bacterias, y restos celulares. Comienza el depósito de fibrina en la pleura y se forman las membranas de loculación, un mecanismo fisiológico que evita la expansión de la infección a otras localizaciones, pero que dificulta enormemente el drenaje del total del derrame pleural. En esta fase se produce un consumo de glucosa, aumentan los niveles de LDH en el líquido pleural, y disminuye significativamente el pH del líquido pleural. La última fase, o fase organizativa, se caracteriza por el crecimiento de fibroblastos en el exudado, produciéndose una membrana fibrosa que recubre la pleura, lo que lleva a la formación de una membrana rígida que impide que el pulmón se expanda (pulmón atrapado). La mecánica ventilatoria de los pacientes con un pulmón atrapado se deteriora enormemente, lo que favorece la aparición de insuficiencia respiratoria tipo II (Light 1981).

También pueden originarse empiemas no relacionados con neumonías, como los empiemas postquirúrgicos, los secundarios a toracocentesis, a colocación de un tubo de tórax, o los asociados a perforaciones esofágicas (Andrews *et al* 1962).

El estudio más amplio y reciente sobre microbiología en el derrame pleural fue realizado en el Reino Unido sobre los datos obtenidos en un ensayo clínico sobre el uso de la estreptoquinasa. Se analizaron los datos de 434 pacientes. La tinción de Gram fue positiva en 250 pacientes (58%). En 151 casos (35%) se produjo el crecimiento de un único microorganismo en cultivo aerobio, en 29 casos (7%) apareció crecimiento único en el cultivo anaeróbico y en 52 casos (12%) se observó crecimiento polimicrobiano. En 70 de los cultivos negativos para los estudios con microbiología convencional se obtuvieron resultados positivos al ser analizados mediante reacción en cadena de polimerasa. El resultado microbiológico definitivo se obtuvo finalmente en 320 pacientes. En el caso de pacientes con Neumonía adquirida en la comunidad los microorganismos más frecuentes fueron: *Streptococcus milleri* en 80 casos, *Streptococcus pneumoniae* en 71 casos, *Staphylococcus aureus* en 34 (7 de los cuales eran resistentes a meticilina -SARM- gérmenes gramnegativos en 29 y anaerobios en 67. En el caso de neumonías intrahospitalarias, el microorganismo más frecuente fue el *Staphylococcus aureus* (21 casos, de los cuales 15 fueron SARM) (Maskell *et al* 2006).

Las manifestaciones clínicas del derrame paraneumónico, dependen en gran medida de si éste está causado por microorganismos aerobios o anaerobios. Los pacientes con neumonía por aerobios con derrame pleural presentan una sintomatología similar a la de los pacientes con neumonía sin derrame (Light *et al* 1980). Los pacientes presentan de forma aguda fiebre con dolor torácico, y tos con abundante expectoración. Cuanto más tiempo pasa desde la aparición de síntomas hasta el inicio de terapia antibiótica, más probable es la aparición de derrame pleural (Taryle *et al* 1980). La presencia de fiebre tras más de 48 horas después del inicio de tratamiento antibiótico en pacientes con neumonía, sugiere la presencia de DP. Se han descrito también derrames pleurales paraneumónicos en pacientes paucisintomáticos que estaban recibiendo corticoides (Finland *et al* 1972). El DP paraneumónico complicado se debe sospechar en pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos que presenten importantes elevaciones persistentes de la temperatura (Tu *et al* 2006). Los pacientes con infecciones bacterianas

anaeróbicas que afectan el espacio pleural presentan clínica subaguda. En una serie de 47 pacientes, 70% tenían síntomas desde 7 días antes del diagnóstico del derrame, con una duración mediana de la sintomatología de 10 días (Bartlett *et al* 1974). En la misma serie de pacientes, el 60% presentaron importante pérdida de peso. Muchos tenían historia de alcoholismo, de episodios de pérdida de conocimiento o algún otro factor predisponente a la broncoaspiración. La mayoría tenían también mala higiene bucal.

En la evaluación inicial de una neumonía, se debe buscar siempre la presencia de DP en la radiografía. Para valorar la cantidad de derrame y la indicación de una toracocentesis se recomienda la realización de una radiografía en decúbito lateral. En caso de presentar un engrosamiento superior a un cm se debe realizar una toracocentesis diagnóstica. En una toracocentesis diagnóstica, en presencia de un derrame pleural paraneumónico, se debe valorar siempre su color y turbidez, y solicitar el estudio microbiológico, anatomopatológico y bioquímico, que incluirá proteínas, LDH, glucosa, pH, y, ADA (Adenosina Deaminasa) si hay sospecha de enfermedad tuberculosa.

Estos estudios son importantes factores pronósticos para los DP, ya que se utilizan para indicar o no la colocación de un tubo de tórax. Así los líquidos que presenten pus, tinción de Gram con resultado positivo, glucosa menor de 40 mg/dl, un cultivo positivo, un pH menor a 7, LDH mayor de tres veces por encima del nivel basal, o derrame loculado serán considerados complicados y precisarán la colocación de tubo de tórax (Hooper *et al* 2010).

El tratamiento de este tipo de derrame es el de la neumonía que lo produce, valorando en función de la clínica, los parámetros bioquímicos y microbiológicos, y los parámetros radiológicos, otras medidas más agresivas como la toracocentesis terapéutica, la colocación de tubo de tórax o incluso la decorticación (Hooper *et al* 2010).

#### **1.1.3.2.2. Derrame pleural tuberculoso (DPTb)**

El derrame pleural tuberculoso debe entrar en el diagnóstico diferencial de cualquier tipo de derrame de tipo exudado. Este puede ser la única

manifestación de la tuberculosis, y por ese motivo debe tomarse siempre en consideración.

Cuando aparece un derrame pleural sin manifestaciones radiológicas intraparenquimatosas sugestivas de tuberculosis, éste se puede deber a una reactivación de la tuberculosis (más frecuente en los países desarrollados) o a una tuberculosis primaria iniciada 6 a 12 semanas antes (Moudgil *et al* 2004). La tuberculosis pleural se cree que se produce a través de focos de caseificación subpleural, que pasan al espacio pleural (Berger *et al* 1973). Parece que la hipersensibilidad tardía (tipo IV) juega un importante papel en la patogenia del derrame pleural tuberculoso. Este tipo de mecanismo de hipersensibilidad, se pone en marcha cuando las proteínas del *Mycobacterium tuberculosis* pasan al espacio pleural (Allen *et al* 1968). El neutrófilo también juega un importante papel en los derrames pleurales de este tipo. En modelos experimentales realizados en conejos sensibilizados al bacilo de Calmette-Guérin (BCG), a los que se les inyecta BCG intrapleural se ha objetivado la aparición de derrame pleural tipo exudado con predominio de neutrófilos durante las primeras 24 horas (Antony *et al* 1985). Si a estos animales se les induce neutropenia disminuye la acumulación de células inflamatorias en la pleura (especialmente de macrófagos). La inyección de neutrófilos al espacio pleural, hace que la cascada inflamatoria vuelva a aparecer (Antony *et al* 1985). Los neutrófilos del espacio pleural parecen secretar sustancias que favorecen la quimiotaxis de monocitos, lo que hace que los monocitos lleguen al espacio pleural y de esta forma, creen granulomas (Antony *et al* 1985). En este modelo experimental, los macrófagos predominan en el líquido pleural del día 2 al 5 (Antony *et al* 1985). También las células mesoteliales parecen jugar un importante papel en la pleuritis tuberculosa, ya que cuando estas son estimuladas con BCG o Interferón  $\gamma$  producen diversas citoquinas estimuladoras de monocitos y macrófagos (Mohammed *et al* 1998). Pasado el día 5, los linfocitos son las células predominantes en el líquido pleural (Widström *et al* 1982-1). Cuando los linfocitos aparecen inicialmente en el líquido pleural, no responden a PPD; sin embargo, a partir del día 5 en adelante, se encuentra reactividad a PPD en la mayor parte de los casos (Widström *et al* 1982-2). La

reactividad frente a PPD de los linfocitos en la sangre periférica es equiparable a la de los linfocitos pleurales (Widström *et al* 1982-2). El cultivo de LP para micobacterias suele ser negativo (Ong *et al* 2003, Escudero Bueno *et al* 1990, Chan *et al* 1991). En cambio sí que se encuentran linfocitos T sensibilizados para *Mycobacterium tuberculosis* (Fujiwara *et al* 1986). Aunque la hipersensibilidad tardía contra las proteínas de la tuberculosis, es probablemente la responsable de la mayor parte de las manifestaciones de la pleuritis tuberculosa, muchos pacientes tienen una intradermorreacción a PPD negativa. Esta paradoja puede explicarse al menos por dos razones. Por una parte en algunos (Ellner *et al* 1978), pero no en todos (Rossi *et al* 1987) los pacientes con pleuritis tuberculosa un clon de monocitos actúa en sangre suprimiendo los linfocitos T sensibilizados frente a tuberculosis de forma específica. Por otra parte parece haber un secuestro de linfocitos T sensibilizados en el espacio pleural en el que intervienen linfocitos T Leu-2 y Leu-3 positivos (Rossi *et al* 1987). El mecanismo por el que se produce DP, se atribuye a que la reacción de hipersensibilidad que tiene lugar en la pleura, aumenta la permeabilidad de los capilares pleurales a proteínas, por lo que aumenta la formación de LP. La inflamación pleural, a su vez, parece actuar disminuyendo la cantidad de líquido que puede ser absorbido por el sistema linfático (Leckie *et al* 1965). Algunos modelos *in vitro* sugieren que la producción de VEGF por parte de las células mesoteliales también puede tener un papel importante (Mohammed *et al* 2003).

Aunque la tuberculosis se considera una enfermedad crónica, la pleuritis tuberculosa se manifiesta como una enfermedad aguda. En una serie de 71 pacientes, 25 (35%) tenían síntomas desde hacía menos de una semana, y 50 (70%) habían tenido síntomas desde hacía menos de un mes (Levine *et al* 2003). En otra serie, 31 de 49 pacientes (63%) presentaban manifestaciones clínicas similares a las de una neumonía bacteriana (Berger *et al* 1973). La mayoría de los pacientes presentaban tos, normalmente seca (70%) y dolor torácico de características pleuríticas (75%). Si ambos síntomas se encuentran presentes, el dolor, generalmente precede la tos. La mayor parte de los pacientes presentaba fiebre, pero la normotermia no descarta el diagnóstico. En

la serie 7 de 49 pacientes (14%) estaban afebriles (Berger *et al* 1973). Ocasionalmente la presentación de la tuberculosis pleural es menos aguda, con dolor torácico leve, febrícula, tos seca, pérdida de peso, y astenia. La edad media de los pacientes con tuberculosis pleural, en los países desarrollados es de alrededor de 50 años (Baumann *et al* 2007), siendo un poco más alta en los pacientes en los que el derrame pleural aparece por recidiva tuberculosa (Moudgil *et al* 1994). Los derrames tienden a ser unilaterales y pueden ser de cualquier tamaño, y si hay lesión en el parénquima pulmonar, tienden a aparecer en el mismo lado (Valdés *et al* 1998).

El diagnóstico de certeza del DPTb depende de la demostración de bacilos tuberculosos en el esputo, el líquido pleural, la pleura, o la presencia de granulomas no caseificantes en una biopsia pleural. El diagnóstico también se puede establecer con alta certeza si se demuestra la presencia de altos niveles de Adenosina Deaminasa (ADA) o interferón  $\gamma$  en el líquido pleural (Light 1998). El estudio de la sangre periférica no es útil. La mayor parte de los pacientes no tienen leucocitosis (Berger *et al* 1973). El TAC torácico muestra afectación parenquimatosa únicamente en menos del 40% de los casos con DPTb (Stead *et al* 1955).

El tratamiento, lógicamente, se centra en los fármacos antituberculosos (Small *et al* 2001). El uso de corticoides es controvertido (Galarza *et al* 1995). Las técnicas quirúrgicas, como la decorticación pleural, se deben reservar para casos que ya han recibido tratamiento con fármacos antituberculosos durante al menos 6 meses, ya que los engrosamientos pleurales tienden a disminuir de forma importante tras el inicio de terapia antituberculosa.

Los DP por *Mycobacteria* atípicas son raros, y la afectación pleural sin afectación parenquimatosa no se ha descrito. Sin embargo, *M. intracellulare* y *M. kansasii* pueden producir afectación pleural cuando afectan al parénquima hasta en el 5% de los casos (Christensen *et al* 1981).

### **1.1.3.2.3. Derrame pleural tumoral (DPT)**

#### **Tumores primarios no pleurales**

La enfermedad pleural maligna es la segunda causa de derrame pleural de tipo exudado, después del derrame paraneumónico. Sin embargo, debido a que muchos derrames paraneumónicos son pequeños y no son subsidiarios de toracocentesis, los derrames malignos son la primera causa de derrame exudativo por la que se realiza una toracocentesis (Light *et al* 1973).

Los carcinomas de pulmón y mama, y el linfoma, representan el 75% de los DPT. El carcinoma metastático de ovario es la cuarta causa, mientras que sarcomas y melanona, constituyen un pequeño porcentaje. Ningún otro tumor único constituye más de un 1% de los derrames pleurales malignos. En aproximadamente el 6% de los DPT, no se llega a identificar el tumor primario (Spriggs *et al* 1968, Anderson *et al* 1974).

Cáncer de pulmón: El cáncer de pulmón es la causa más frecuente de DPT (Johnston *et al* 1976). Cuando los pacientes con cáncer de pulmón son evaluados por primera vez, aproximadamente el 15% tienen derrame (Naito *et al* 1997). A lo largo de la evolución de la enfermedad, sin embargo, al menos el 50% de los pacientes con cáncer de pulmón extendido desarrollan derrame pleural. El derrame pleural aparece en todos los tipos de carcinoma pulmonar, pero parece ser más frecuente en el adenocarcinoma (Johnston *et al* 1976, Chernow *et al* 1977). Los pacientes con carcinoma de células pequeñas tienen una menor incidencia (3%-10%) (Herrstedt *et al* 1992, Chieng *et al* 2001). Los pacientes con cáncer de pulmón y anticuerpos anti-p53 tienen derrame con mayor frecuencia (Lai *et al* 1998). En algunas series, hasta el 26,8% de los pacientes muestran afectación tumoral de la pleura visceral, pero no presentan derrame (Shimizu *et al* 2004). Esto repercute en la supervivencia a 5 años de estos pacientes (Shimizu *et al* 2004). La presencia de derrame casi siempre indica que no es curable mediante cirugía, incluso cuando la citología pleural es negativa (Sugiura *et al* 1997). En la clasificación de la Asociación Internacional

para el Estudio del Cáncer de Pulmón se considera que si un carcinoma pulmonar afecta la pleura, se encuentra en un estadio IV (Rami-Porta *et al* 2009). Un importante tipo a tener en cuenta son los pacientes con derrame pleural ipsilateral a un carcinoma pulmonar. En una serie de 21 pacientes con estas características sólo 5 cumplían criterios de reseccabilidad antes de la operación; sin embargo, al realizarse la toracotomía se objetivó la irreseccabilidad de estos tumores debido a invasión mediastínica (Rodríguez Panadero 1995). Por ello, ante un DP con citología negativa en pacientes con un cáncer pulmonar ipsilateral, se recomienda la realización de videotoracoscopia, y si esta es negativa, se recomienda la realización de TAC para la evaluación de los ganglios linfáticos mediastínicos. En función de dichos resultados, se debe evaluar la posibilidad de realizar una mediastinoscopia.

Cáncer de mama: Es la segunda causa de DPT. En el cáncer de mama diseminado, hasta el 48% de los pacientes presentan derrame pleural (Fracchia *et al* 1970, Goldsmith *et al* 1967). En esta última serie el derrame era más frecuentemente debido a diseminación linfática (63%). Los DP eran del mismo lado que el tumor primario de mama en el 58% de los pacientes, en el lado contralateral en el 26%, y en ambos lados en el 16%. En otra serie, el derrame era ipsilateral en el 70%, contralateral en el 20%, y bilateral en el 10% (Banerjee *et al* 1994). Los derrames ipsilaterales eran menos frecuentes si incluían radioterapia como parte del tratamiento inicial (Apffelstaedt *et al* 1995). Con el cáncer de mama, el intervalo medio entre la aparición del tumor primario y la aparición del derrame pleural es de aproximadamente 2 años (Apffelstaedt *et al* 1995), pero este intervalo puede ser tan largo como 20 años (Fentiman *et al* 1981). Evidentemente estos datos se están modificando en los últimos años como consecuencia de las nuevas terapéuticas en este tipo de cáncer.

Linfomas y tumores hematológicos: Los linfomas, incluida la enfermedad de Hodgkin, son la tercera causa de DPT (Das *et al* 2006). La prevalencia de DP como forma de presentación en la enfermedad de Hodgkin, varía entre 7 a 21% (Romano *et al* 1998, Tateishi *et al* 2004). A lo largo de la evolución de esta enfermedad la incidencia es de aproximadamente un 16% (Vieta *et al*

1941). Los pacientes tienen casi siempre afectación de los ganglios linfáticos intratorácicos, muchas veces sin afectación pleural microscópica (Stolberg *et al* 1964). La mayoría de estos pacientes corresponden al subtipo esclerosis nodular (Berkman *et al* 1996). Sólo el 3% de los derrames por enfermedad de Hodgkin son quilotórax. La prevalencia de derrame como forma de presentación en los pacientes con linfoma no Hodgkin varía entre un 6% y un 50% (Romano *et al* 1998, Tateishi *et al* 2004, Xaubet *et al* 1985). Con esta neoplasia, 20-70% presentan enfermedad mediastínica y el 90% tienen enfermedad en otra localización. Los linfomas de células grandes, se asocian más a enfermedad pleural que los de células pequeñas (Berkman *et al* 1996). La presencia de DP en el momento de presentación no afecta a la supervivencia o a las tasas de remisión estos pacientes (Elis A *et al* 1998). La citología es positiva en el líquido pleural en casi todos los casos (Elis *et al* 1998). A lo largo de la evolución de la enfermedad, tanto como el 40% de los casos, tendrán un DP (Okada *et al* 2004). Aproximadamente el 20% de los derrames presentes en los linfomas tipo no-Hodgkin son quilotórax (Xaubet *et al* 1985).

La prevalencia de DPT en el mieloma múltiple es de aproximadamente el 1% (Kamble *et al* 2005). Los derrames se desarrollan en una media de 12 meses tras el diagnóstico del mieloma. La mayoría se asocian a plasmocitomas pleurales o de la pared torácica o a lesiones en el parénquima pulmonar en el TAC (Kamble *et al* 2005). Al igual que en el cáncer de mama, estas cifras están variando con las nuevas terapias de introducción reciente.

Patogenia del DPT: Probablemente en la mayor parte de los casos, el derrame se produce por un aumento de permeabilidad de la pleura, mediado, entre otros mecanismos, por un aumento en la producción tumoral de VEGF (Light *et al* 1997). En algunas series, los niveles de VEGF son mayores en los DPT que en los DPI (Ishimoto *et al* 2002). La obstrucción del conducto linfático también parece intervenir en la formación del derrame, por afectar a los estomas en la pleura parietal (Leckie *et al* 1965) o por bloqueo del conducto torácico, como en el caso de los linfomas, lo que crea un quilotórax. Otro mecanismo por el que se puede producir el derrame es mediante la formación

de una atelectasia en el lóbulo inferior por la oclusión de un bronquio lobar (Light *et al* 1980). La afectación del pericardio, o procesos que pueden relacionarse con la neoplasia como el Trombo embolismo pulmonar (TEP), la neumonía, o secundarios al tratamiento, también pueden favorecer la aparición de este tipo de derrames.

El síntoma fundamental en este tipo de pacientes es la disnea, que ocurre en más del 50% de los pacientes (Chernow *et al* 1977). Tras la visualización de un derrame en un paciente con una neoplasia, se debe realizar un TAC torácico, para evaluar el derrame pleural y la afectación de los ganglios mediastínicos (Rami-Porta *et al* 2009).

El análisis del LP es clave para el diagnóstico de estos pacientes. Se trata casi siempre de un exudado según la definición de los criterios de Light (Light *et al* 1972, Assi *et al* 1998). La cantidad de líquido que debe ser enviado para analizar es motivo de controversia. Clásicamente se ha considerado que a mayor cantidad de líquido, mayor sensibilidad de las pruebas citológicas; sin embargo, en un estudio (Sallach *et al* 2002) al comparar la sensibilidad entre los cuartiles superior e inferior de cantidad de líquido remitido a anatomía patológica, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. La presencia de células rojas en cantidad mayor a  $100000/\text{mm}^3$  es sugestiva de enfermedad pleural maligna; además suelen tener predominio de linfocitos en un 45% de los casos, otras células mononucleares en el 40%, y de polimorfonucleares en el 15% (Light *et al* 1973). El diagnóstico definitivo de este tipo de derrames se produce mediante análisis citológico o biopsia pleural. La utilidad de enviar más de dos muestras de líquido pleural para análisis citológico es muy baja (Bielsa S *et al* 2008).

El tratamiento de este tipo de derrames es, fundamentalmente, el del tumor que lo haya causado. En los derrames pleurales recidivantes que ocasionen un aumento de la disnea, se debe plantear el uso de agentes para favorecer la pleurodesis o la colocación de un cateter PleurX, salvo que el derrame sea causado por una atelectasia; en este caso se debe controlar el

tumor intraluminal para evitar la formación de la atelectasia y el derrame pleural.

### **Tumores pleurales primarios**

Mesotelioma: Los mesoteliomas malignos se desarrollan a partir de las células mesoteliales que se encuentran en la cavidad pleural. Estos deben diferenciarse del tumor fibroso solitario pleural, que tiene un excelente pronóstico. El factor de riesgo más importante para el desarrollo del mesotelioma es la exposición al asbesto (Berman *et al* 2003). La incidencia de mesotelioma en Estados Unidos ha crecido a lo largo de las últimas décadas, llegándose a una incidencia anual de 2300 casos en 2004 (Bang *et al* 2006). Se trata de un tumor 6 veces más frecuente en hombres que en mujeres, probablemente debido al factor de la exposición (Bang *et al* 2006). En sus estadios iniciales aparece como granulaciones múltiples de color blanco o grisáceo (Branscheid *et al* 1991). Mientras progresa la enfermedad, la pleura se engrosa y pasa a tener un aspecto nodular, posteriormente, el tumor se extiende a lo largo de toda la pleura. En casos avanzados, este tumor puede llegar a afectar al diafragma, corazón, pulmón, hígado y otras estructuras (Lee *et al* 2001). La mayoría de los pacientes con mesotelioma maligno, presentan dolor torácico insidioso como manifestación inicial, llegando a pasar meses hasta que acuden a consulta. A lo largo de la progresión de la enfermedad, pueden aparecer otros síntomas como pérdida de peso, tos seca, disnea o febrícula (Pisani *et al* 1998). En la radiografía de tórax se puede objetivar la presencia de derrame pleural en el 75-90% de los casos (Kawashima *et al* 1990). Para completar el estudio sobre la extensión de la enfermedad se debe realizar un TAC torácico (Kawashima *et al* 1990). El LP en este caso es amarillo en el 50% de los casos y serosanguinolento en el resto de los casos. Se trata de un líquido tipo exudado, el nivel de glucosa en un tercio de los casos es inferior a 50 mg/dl, y su pH también en un tercio de los casos, es inferior a 7,20. Los pacientes que muestran una de estas dos características, presentan peor pronóstico. El LP normalmente presenta abundante celularidad, con una mezcla de células mesoteliales benignas, malignas diferenciadas y pobremente

diferenciadas, junto con un número variable de linfocitos y polimorfonucleares (Gottelherer *et al* 1991, Klempman 1968). Existen diversos biomarcadores en el LP y suero que pueden ser de utilidad en su diagnóstico (ver más adelante). El tratamiento quirúrgico parece ser el único curativo (Butchart *et al* 1981). Algunos pacientes pueden beneficiarse de tratamiento quimioterápico con cisplatino junto con pemetrexed o raltitrexed (Goeminne *et al* 2006). El pronóstico del mesotelioma no es bueno, con una supervivencia media de 8 a 12 meses después del diagnóstico (Van Gelder *et al* 1999).

Tumor fibroso solitario pleural: Este tipo de tumor recibe numerosos nombres en la literatura como mesotelioma localizado, mesotelioma benigno fibroso, fibroma localizado benigno y fibroma submesotelial (Sandvliet *et al* 2000). Su pronóstico es excelente (Sandvliet *et al* 2000). No se relaciona con la exposición al asbesto. Se trata de tumores encapsulados amarillentos con un abundante componente vascular (Hutchinson *et al* 1963). Dos tercios de estos tumores provienen de la pleura visceral, mientras que un tercio proviene de la parietal. A veces, estos tumores invaden el pulmón y la pared torácica. Este tipo de tumor se asocia a DP en el 10-20% de los casos (Okike *et al* 1978, Rena *et al* 2001, Ulrik *et al* 1998), pero la presencia de derrame no se asocia con peor pronóstico (Antman *et al* 1981). Otros síntomas como tos, dolor torácico y disnea son frecuentes en estos pacientes (Briselli *et al* 1981). Otras manifestaciones, como la osteoartropatía hipertrófica pulmonar (Okike *et al* 1978), o el síndrome de Doege-Potter (Briselli *et al* 1981) pueden asociarse a estos tumores. El diagnóstico se realiza generalmente mediante Videotoracoscopia (VATS), aunque en algunos casos es necesaria una biopsia transtorácica (Weynand *et al* 1997). El tratamiento de elección es la resección mediante VATS (Takahama *et al* 2004). Para su tratamiento es especialmente importante la resección completa con bordes libres, ya que puede presentar recidivas en un número muy alto de los casos.

Otras entidades raras como el linfoma de cavidades (Ibrahimbacha *et al* 1999) y el linfoma asociado a piotórax (Nakatsuka *et al* 2002) también se consideran tumores pleurales primarios.

#### **1.1.3.2.4. Otros derrames pleurales tipo exudado**

Se incluyen aquí otras causas menos frecuentes de derrame pleural, entre las que destacamos:

Tromboembolismo Pulmonar (TEP): Es una de las enfermedades pulmonares más difíciles de diagnosticar. Tiene una incidencia aproximada de 500000 personas al año en Estados Unidos (EEUU) (Fedullo *et al* 2005). Se considera que entre un 30 y un 50 de los pacientes con TEP presentan en la radiografía la presencia de un derrame pleural (Bynum *et al* 1978, Stein *et al* 1972). Sin embargo en la clínica es raro sospechar TEP en un paciente que ha tenido un DP, lo que hace que muchas veces no se diagnostique el TEP cuya única manifestación es un derrame pleural. Estos derrames suelen ser relativamente pequeños, ocupando generalmente alrededor del 15% del hemitórax (Bynum *et al* 1978). El mecanismo más importante para la formación de este derrame es un aumento en la permeabilidad de los capilares pulmonares debido a la liberación de distintos mediadores inflamatorios inducidos por la isquemia en el parénquima pulmonar, como el VEGF (Cheng *et al* 1990). La mayor parte de los DP secundarios a TEP suelen ser de tipo exudado, contrariamente a lo que se pensaba antes (Marel *et al* 1993).

Enfermedades pancreáticas: La pancreatitis aguda puede ocasionar un derrame pleural de tipo exudado en un porcentaje relativamente bajo de los casos (3-17%) (Kaye 1968). Es un marcador de gravedad de la pancreatitis (Heller *et al* 1998). El derrame en estos casos se forma por paso de líquido exudativo a través del diafragma (Gumaste *et al* 1992). Este líquido contiene una alta concentración de enzimas pancreáticos, que pueden tener un importante papel en obstruir el sistema linfático, que lleva a la acumulación de más líquido (Kaye 1968). Su diagnóstico depende de la demostración de altos niveles de amilasa en el líquido pleural (Kaye 1968). Los abscesos pancreáticos (Miller *et al* 1974) y los pseudoquistes pancreáticos (Rockey *et al* 1990) también pueden ocasionar derrame.

Otros trastornos abdominales: El absceso subfrénico, los abscesos intrahepáticos o intraesplénicos, la perforación esofágica, o los procesos quirúrgicos intraabdominales, pueden asociarse a un derrame pleural de tipo exudado.

Derrame pleural inducido por fármacos: La nitrofurantoína, el dantroleno y otros medicamentos pueden producir derrame pleural tipo exudado (Sahn *et al* 2011)

Otros procesos: El síndrome de Dressler, el síndrome de Meigs, el síndrome de hiperestimulación ovárica, las colagenosis, el hemotórax y el quilotórax, pueden provocar un derrame pleural de tipo exudativo.

#### **1.1.4. BIOMARCADORES PLEURALES**

Los NIH (*National Institutes of Health* de los Estados Unidos) definen biomarcador o marcador biológico como aquella sustancia utilizada como indicador de un estado biológico. Debe ser medida de forma objetiva y ser evaluada como un indicador de un proceso biológico normal, de un estado patológico o de respuesta a un tratamiento. En este sentido, se han intentado medir distintas sustancias biológicas en líquido pleural, que se asocien de forma estrecha con patologías específicas, como son la ADA que se relaciona con la tuberculosis pleural, la amilasa, que se relaciona con las enfermedades del páncreas, o con roturas de páncreas o esófago, el péptido natriurético tipo B (BNP) relacionado con la insuficiencia cardíaca, los triglicéridos con el quilotórax, o el factor reumatoide con la artritis reumatoide. Algunos biomarcadores pleurales como el pH o la glucosa sirven para apoyar determinados tratamientos, como la colocación de un tubo de tórax. Otros, como la LDH y las proteínas, sirven para distinguir entre los derrames inflamatorios y los no inflamatorios (Hooper *et al* 2010). En este sentido, en 1972 se publicaron los criterios de Light, en los que es preciso obtener una muestra simultánea de suero y de líquido pleural para realizar la clasificación entre exudado y trasudado. Los criterios de Light tienen una sensibilidad del

98% y una especificidad del 83%. Han sido criticados por diversos autores debido a que requieren la toma simultánea de muestras de sangre y de líquido pleural, por lo que se han propuesto otros criterios, como ya se ha comentado (Heffner *et al* 1997).

## **pH**

La acidificación del LP (pH <7,30) se encuentra en los derrames malignos, tuberculosos o infecciosos complicados, en los derrames de las conectivopatías (en particular en los secundarios a la artritis reumatoide), y en los derrames por rotura esofágica. Sin embargo, el pH no distingue entre estas etiologías (Good *et al* 1980). La acidificación del líquido pleural se produce por un aumento del ácido láctico y de dióxido de carbono, además de una alteración en el flujo de hidrogeniones a través de las láminas pleurales. Un aumento en el consumo de glucosa en esta situación hace que el líquido pleural con pH bajo suele asociarse a un nivel bajo de glucosa (Potts *et al* 1978).

Además los niveles bajos de pH se asocian en el caso de los derrames malignos con una menor supervivencia, enfermedad más extensa, y con un aumento de la probabilidad de que la pleurodesis resulte fallida (Sahn *et al* 1988). En un meta-análisis en el que se incluyeron 417 pacientes con derrames pleurales malignos, se encontró que un pH menor de 7,28 se asociaba con una supervivencia media de 2,5 meses y supervivencia a los 3 meses de 38,9% (intervalo de confianza 95% de 31,1% a 46,8%) comparado con una supervivencia media de 4,3 meses, y supervivencia a los 3 meses de 61,6% (intervalo de confianza del 95% de 55,7% a 67,4%) en pacientes con un pH mayor de 7,28 (Heffner *et al* 2000).

El uso más habitual del pH del líquido pleural es para tomar la decisión de colocar un tubo de drenaje torácico. Un meta-análisis ha encontrado que un pH menor a 7,20 es el discriminador más específico de derrame pleural infeccioso complicado (Heffner *et al* 1995).

En los derrames pleurales loculados es importante tener en cuenta que el pH varía enormemente entre las distintas cavidades del derrame, por lo que

en un paciente que presente otros datos de derrame pleural complicado este valor debe ser analizado con precaución (Maskell *et al* 2004).

La técnica utilizada para obtener y analizar el LP tiene importantes consecuencias en los resultados del pH. Un estudio prospectivo encontró que la exposición de la muestra al aire hace que el pH suba 0,05 en el 71% de las muestras. Además, si se añade 0,2 ml de anestésico local a la muestra, se produce una reducción en el pH de 0,15 (intervalo de confianza para el 95% de 0,13 a 0,18) (Rahman *et al* 2008). Por lo tanto el LP debe obtenerse sin ser expuesto al aire y sin que haya entrado en contacto con el anestésico local. Además, el pH pleural puede modificarse si el procesamiento de la muestra se demora durante más de una hora. Para medirlo se debe utilizar un analizador de gases sanguíneos arteriales (Lesho *et al* 1997). En la práctica puede ser difícil cumplir todos estos requerimientos. Cuando no se puedan dar todos estos requisitos las guías de la British Thoracic Society (BTS) recomiendan tomar decisiones en función de la clínica del paciente (Hooper *et al* 2010).

## **Glucosa**

En la pleura sana, la glucosa difunde libremente a través de la membrana pleural. En dicha situación el nivel de glucosa en líquido pleural es el mismo que el nivel de glucosa en sangre (Sahn *et al* 2008). Se puede ver una disminución en los niveles de glucosa del LP en los derrames pleurales complicados, empiema, o derrames pleurales asociados con tuberculosis, cáncer, artritis reumatoide y rotura esofágica. Las cifras más bajas de glucosa se pueden ver en la artritis reumatoide y en el empiema (Light RW *et al* 1973). Aunque la glucosa normalmente está disminuida en los derrames pleurales complicados, y se correlaciona con el pH, es un indicador mucho menos fiable de necesidad de colocación de un tubo torácico (Heffner *et al* 1995). Cuando se mide la glucosa, la muestra debe ser enviada al laboratorio en un tubo con oxalato de fluoruro.

## **Lactato Deshidrogenasa (LDH)**

La LDH es una enzima que se encuentra en muchos tejidos del cuerpo. Corresponde a la categoría de las oxidoreductasas, en la que el piruvato es reducido a lactato gracias a la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup>. Existen 5 isoenzimas distintas según el tipo de célula que las produzca. Los isotipos son: LDH-1 (en glóbulos rojos y células miocárdicas), LDH-2 (en el sistema reticulo-endotelial y leucocitos), LDH-3 (en los pulmones), LDH-4 (en los riñones, placenta y páncreas) y LDH-5 (en el hígado y el músculo esquelético).

Esta enzima pasa a la sangre ante cualquier tipo de destrucción de tejidos. Por lo tanto sus niveles son un marcador inespecífico. Puede ser utilizada como un índice de proliferación en el seguimiento de una neoplasia y es relativamente valiosa para el seguimiento y diagnóstico del infarto agudo de miocardio (Nelson *et al* 2000).

Los niveles de LDH en LP sirven para diferenciar exudados de trasudados. La mayoría de los pacientes que cumplen criterios de Light únicamente por los niveles de LDH en pleura, pero no por los niveles de proteínas en pleura, presentan un derrame paraneumónico o maligno. Aunque inicialmente se pensaba que los niveles de LDH se elevaban únicamente en los derrames malignos (Wroblewski *et al* 1959), posteriormente se ha demostrado que sus niveles se encuentran elevados en la mayoría de los derrames pleurales de tipo exudado (Light *et al* 1972); por lo tanto, no tiene ninguna utilidad en el diagnóstico diferencial de los derrames pleurales de tipo exudado. Los niveles de LDH en el líquido pleural, son indicativos del grado de inflamación que hay en la pleura, por lo que algunos autores (Light 2007) han propuesto su medición de forma rutinaria en los derrames de etiología desconocida. Si los niveles de LDH en un seguimiento de un derrame de etiología desconocida aumentan progresivamente, se debe tomar una actitud agresiva frente al derrame; si por el contrario, la LDH baja progresivamente se puede optar por una actitud expectante.

Ya que la LDH se trata de una enzima que se encuentra en altas concentraciones en los glóbulos rojos, se debe tener especial consideración a la hora de evaluar los niveles de LDH en los derrames pleurales traumáticos o sanguinolentos. Se supone que los niveles de LDH en derrames pleurales obtenidos mediante una técnica que ha sido especialmente traumática, tendrá unos niveles de LDH más altos que los valores reales de LDH en el líquido pleural. Sin embargo algunos estudios sugieren que los niveles de LDH no se ven aumentados de forma dramática por los glóbulos rojos. En un estudio realizado por Light *et al* (1973) se obtuvieron 12 líquidos pleurales con más de 100000 hematíes/mm<sup>3</sup> y se analizaron las isoenzimas de LDH. Sólo en uno de los 12 casos los niveles de la isoenzima producida por los hematíes era mayor al 5% de los niveles de la isoenzima en suero.

Se ha estudiado la utilidad de diferenciar las distintas isoenzimas de LDH en el diagnóstico etiológico del derrame pleural tipo exudado en numerosas ocasiones, y se ha demostrado que su papel es reducido (Light *et al* 1973, Raboo *et al* 1966, Lossos *et al* 1999). En general, los derrames que tienen niveles altos de LDH, presentan en su mayoría las isoformas LDH-4 y LDH-5. Esto puede ser debido a que estas isoenzimas son producidas por las células blancas presentes en el derrame. Un tercio de los derrames malignos tienen un patrón de isoenzimas específico, caracterizado por unos niveles más altos de LDH-2 y menos niveles de LDH-4 y LDH-5 (Light *et al* 1973). Este patrón no guarda relación alguna con la histología del tumor que ha producido el derrame. Por el momento, la única situación en la que puede ser de utilidad el análisis de las distintas isoformas de LDH es en el derrame con abundantes células rojas en un paciente en el que se sospecha un derrame de tipo trasudado. En este caso, si el derrame cumple criterios de Light únicamente por los niveles de LDH y en el análisis de las isoenzimas se demuestra que hay un predominio de la isoforma LDH-1 queda demostrado que el aumento de LDH se debe a la sangre en el líquido pleural.

## **Proteínas totales y proteinograma**

Los niveles de proteínas totales en el LP son normalmente más altos en los DP de tipo exudado que en los de tipo trasudado. Esta es la base para diferenciar entre ambos tipos de derrame. Sin embargo los niveles de proteínas en el LP no permiten establecer diferencias entre las distintas causas que producen derrames de tipo exudado. En algunos casos, existen derrames tipo exudado que pueden no tener niveles altos de proteínas; suelen ser debidos a derrames pleurales paraneumónicos o de etiología maligna (Light *et al* 1972).

El proteinograma electroforético del LP es muy similar al del suero, salvo por la albúmina, que se encuentra en proporciones más altas en el LP (Zinneman *et al* 1957, Telvi *et al* 1979). Los niveles de IgG, IgA e IgM en pleura son siempre inferiores a sus niveles en suero y aparentemente no tienen ningún valor diagnóstico (Telvi *et al* 1979). La IgE es la única que tiene utilidad. El equipo de Yokogawa (Yokogawa *et al* 1976) midió los niveles de IgE en el derrame pleural de 5 pacientes con paragonomiasis. En los 5 casos, los niveles de Ig E excedían los niveles en suero, y eran superiores a 4000 UI. Otros estudios también han relacionado los niveles de IgE en suero con los derrames pleurales con predominio de eosinófilos (Nash *et al* 1958).

## **Proteína C reactiva (PCR)**

Los niveles de proteína C reactiva en LP pueden ser de utilidad en los derrames con predominio de neutrófilos, siendo sus niveles mayores a 45 mg/l en los de etiología paraneumónica (Porcel *et al* 2012). Los mismos autores propusieron un punto de corte de 100 mg/l para diferenciar los derrames complicados de los no complicados.

## **Procalcitonina**

Se ha valorado la utilidad de la procalcitonina en el LP para diferenciar los tipos de derrame pleural, encontrándose una relación significativa entre los niveles de procalcitonina y los derrames pleurales paraneumónicos y los empiemas (Wang *et al* 2009).

## **Adenosin Deaminasa (ADA) e Interferón- $\gamma$**

La ADA es una enzima producida por los linfocitos. Sus niveles se encuentran aumentados en la mayor parte de los DPTb. Un meta-análisis de 63 estudios sobre el uso del ADA para diagnóstico en el DP estableció una sensibilidad del 92%, especificidad del 90% y un valor predictivo positivo y negativo de 9 y 0,1 respectivamente (Liang *et al* 2008).

La ADA también se eleva en los DP por artritis reumatoide, en los empiemas, y ocasionalmente en los DPT. Niveles extremadamente elevados de esta enzima en el LP deben hacer sospechar causas no tuberculosas como linfoma o empiema (Porcel JM *et al* 2010).

Se ha utilizado la isoenzima ADA-2 o la determinación de ADA únicamente en los DP con predominio de linfocitos para reducir los falsos positivos (Zemlin *et al* 2009).

La determinación de la ADA es barata y fiable, y no se alteran sus niveles si el líquido se mantiene almacenado a -4 °C, hasta 28 días. (Antonangelo *et al* 2006).

Los niveles de interferón- $\gamma$  en el líquido pleural han demostrado una sensibilidad y especificidad similares a los de la ADA en un meta-análisis (Greco *et al* 2003). Sin embargo, esta determinación resulta más cara. Se han estudiado otras pruebas relacionadas con el interferón como los IGRAs (*Interferon Gamma Release Assays*), pero no llegan a ser tan útiles como la ADA (Trajman *et al* 2007), por lo que no suelen ser utilizados.

Un problema muy importante en los DPTb es detectar la tuberculosis resistente. La opción más rentable es realizar un cultivo de una biopsia pleural obtenida mediante videotoracoscopia. De todas formas, una revisión de 7549 casos de pleuritis tuberculosa realizado por el CDC (*Center for Disease Control*) de Estados Unidos demostró que los patrones de resistencia a drogas en los cultivos obtenidos de pleura son similares a los de la tuberculosis pulmonar en la misma zona (Baumann *et al* 2007). Por lo tanto, el tratamiento debería ser

el que se utilice para cubrir a las micobacterias con el espectro de resistencias típico de cada área.

### ***Brain Natriuretic Peptide (BNP) o Péptido natriurético tipo B y Aminoterminal pro BNP (NT-proBNP) o Fracción aminoterminal del Propéptido de BNP***

El BNP y el NT-proBNP son péptidos sintetizados por los miocitos ventriculares en respuesta al aumento de la tensión ventricular. Estas sustancias se encuentran elevadas en sangre en la insuficiencia cardiaca crónica (Kolditz *et al* 2006, Porcel *et al* 2004, Porcel *et al* 2007, Tomcsányi *et al* 2004). Ambas sustancias se pueden medir tanto en suero como en líquido pleural para confirmar el diagnóstico de derrame secundario a insuficiencia cardiaca (Porcel *et al* 2009). La medición de de NT-pro-BNP es muy costosa y dificultosa, por lo que raramente se utiliza en la práctica. Sin embargo, diferentes estudios valoran los niveles de estos dos péptidos, tanto en líquido pleural como en sangre en el contexto de los DP, ya que podrían servir para discriminar los DPC. En este sentido, un estudio (Long *et al* 2010) analizó los LP de 80 pacientes con DP de distinta etiología, demostrando que el NT-pro-BNP tiene una fiabilidad más alta que el BNP para diagnosticar los derrames pleurales. La utilidad del NT-pro-BNP en LP ha sido evaluada en un meta-análisis de 10 publicaciones, con un total de 429 líquidos de origen cardiaco y 691 líquidos de otra causa. Esta prueba demostró en dicho estudio una sensibilidad y especificidad del 94%, una *Odds Ratio* diagnóstica de 246, y un área bajo la curva ROC (*Receiver operating characteristics curve*) de 0,98 (Janda *et al* 2010).

### **Colesterol y Triglicéridos**

El colesterol y los triglicéridos pueden ser de gran utilidad para el diagnóstico diferencial de los DP de color turbio o blanco. El quilotórax se produce por una rotura del conducto torácico (generalmente por un traumatismo o como complicación después de una cirugía) dentro del tórax. Cuando este fenómeno se produce, la cavidad pleural se ve inundada por la

linfa, que contiene una gran concentración de quilomicrones, formados en gran parte por triglicéridos (Doerr *et al* 2005). El pseudoquilotórax consiste en la acumulación de cristales de colesterol en el espacio pleural. La pleuritis por artritis reumatoide y la debida a tuberculosis son las dos causas más frecuentes de pseudoquilotórax (Ferguson *et al* 1966).

Si en el análisis del LP se demuestra la presencia de quilomicrones, es un quilotórax, mientras que si hay cristales de colesterol, es un pseudoquilotórax. Un quilotórax tendrá niveles altos de triglicéridos, normalmente >110 mg/dl y se puede excluir su diagnóstico si los niveles de triglicéridos en la pleura son de <50 mg/dl. En el caso de un pseudoquilotórax, los niveles de colesterol son >200 mg/dl (Hillerdal *et al* 1997, Wrightson *et al* 2010, Staats *et al* 1980).

### **Amilasa**

Los niveles de amilasa en LP se consideran elevados si son mayores del límite alto de la normalidad para suero, o si la ratio líquido pleural/suero es >1 (Sahn 1988). Estos datos sugieren pancreatitis aguda, pseudoquiste pancreático, rotura del esófago, embarazo ectópico o infiltración pleural maligna (típicamente la metástasis de adenocarcinoma) (Joseph *et al* 1992, Sherr *et al* 1972). El 10% de los DPT aumentan los niveles de amilasa (Kramer *et al* 1989), aunque esta determinación no se utiliza normalmente en este contexto (Branca *et al* 2001).

El estudio de las isoenzimas de la amilasa puede ser útil, pero no está disponible de forma rutinaria en todos los laboratorios. La elevación de los niveles de amilasa salivar sugiere rotura esofágica o malignidad (Joseph *et al* 1992, Sherr *et al* 1972). Si se sospecha una rotura esofágica, el estudio debe ser completado mediante técnicas más específicas como la radiografía con contraste baritado o por técnicas endoscópicas. Los DP asociados a enfermedad pancreática generalmente contienen la isoenzima pancreática (Joseph *et al* 1992). Más del 50% de las pancreatitis tienen asociado un derrame pleural. Los pacientes con pancreatitis aguda y DP tienen una enfermedad más grave, y tienden a hacer un pseudoquiste en mayor porcentaje que aquellos que no

tienen derrame pleural (Lankisch *et al* 1994). La lipasa pancreática ha sido estudiada en muy pocas ocasiones en el LP, aunque se han descrito casos de elevación de sus niveles, como ocurre con la amilasa (Iglesias *et al* 1996).

### **Otros biomarcadores**

Hay otros biomarcadores que pueden medirse en el líquido pleural, pero que se utilizan actualmente de forma minoritaria en la clínica, aunque posiblemente alguno de ellos tenga mayor interés en el futuro.

Mesotelina: Es una glicoproteína cuyos niveles aumentan en suero y en líquido pleural en pacientes con un derrame pleural por mesotelioma maligno. (Sherpereel *et al* 2006, Creaney *et al* 2007). La mesotelina en LP ha demostrado tener una sensibilidad de 48-84% y una especificidad de 70-100% para el diagnóstico de mesotelioma (Sherpereel *et al* 2006, Davies *et al* 2009) El valor predictivo negativo de esta prueba se ve limitado por los falsos negativos en el mesotelioma sarcomatoide (Robinson *et al* 2003). Otros tumores pueden dar resultados positivos ante esta prueba como son el adenocarcinoma broncogénico, el carcinoma metastático pancreático, el linfoma y el cancer de ovario (Creaney *et al* 2007, Cristaudo *et al* 2007, Hassan *et al* 2006). Un resultado positivo de mesotelina en LP, por lo tanto, puede indicar la necesidad de obtener una muestra histológica, pero un resultado negativo, no es significativo. Aunque la mesotelina tiene mayor eficacia diagnóstica que otros marcadores tumorales, su utilidad clínica se suele ver limitada al estudio de DP sin diagnóstico claro inicial, y no se recomienda su uso de forma rutinaria (Abbas *et al* 2008). Este marcador podría ser útil también en el seguimiento de los pacientes con mesotelioma (Hassan *et al* 2006).

Fibulina 3: Se trata de una glicoproteína extracelular que media en las interacciones intercelulares y que tiene un importante efecto angiogénico. En un estudio prospectivo se midió esta sustancia en 74 pacientes con mesotelioma, 39 con derrames benignos y 54 con derrames malignos que no eran mesoteliomas. Utilizando un valor de corte de 346 ng/ml, la fibulina 3 discrimina los DP por mesotelioma de los derrames de otra causa con una

sensibilidad del 84%, una especificidad del 92% y un área bajo la curva de 0,93. Si esto se confirma en futuros estudios este biomarcador puede ser de gran utilidad en el diagnóstico del mesotelioma (Pass *et al* 2012).

Marcadores tumorales "clásicos": En un meta-análisis de 45 publicaciones, en el que se incluyeron 2834 pacientes con derrame maligno y 3251 pacientes con derrame no maligno se encontró una sensibilidad del 54% y una especificidad del 94% para el antígeno carcinoembrionario (CEA) (Hsi *et al* 2008). En otro meta-análisis del mismo grupo, se valoró la sensibilidad y especificidad de otros cuatro marcadores pleurales para diferenciar derrames malignos de benignos; los resultados para estos marcadores fueron: *Cancer antigen 125* (CA-125), 0,51/0,96; CA-15,3 0,51/0,96; CA 19,9 0,25/0,96 y *Cytokeratin fragment 21,1* (CYFRA 21,1) 0,55/0,91 (Liang *et al* 2008). Estos marcadores también puede tener valor pronóstico (Bielsa *et al* 2009).

Factor C4 del complemento: Puede ser de utilidad para el estudio de DP debidos a Artritis reumatoide (AR). En un estudio, los pacientes con AR presentaron en todos los casos niveles de FC4 <0,04 g/l mientras que sólo 2 de 118 controles los presentaron (Pettersson *et al* 1982).

Factor Reumatoide: Presenta habitualmente un título de >1:320.142 en los derrames producidos por AR. De todas formas puede ser estar presente en derrames pleurales de otra etiología, y generalmente sus niveles en la pleura son similares a los del suero, por lo que aporta poco al diagnóstico (Pettersson *et al* 1982).

Anticuerpos Antinucleares (ANA): Niveles de ANA elevados, y una Ratio líquido pleural/suero aumentada es sugestivo de pleuritis por lupus eritematoso sistémico, pero este aumento también puede aparecer en derrames malignos (Wang *et al* 2000) En un estudio realizado por Porcel *et al* (2007) se demostró una sensibilidad de 100% (IC 95%: 97% a 100%) y una especificidad de 94% (IC 95%: 91% a 97%) para este test en el LP. Estos valores son similares a los que aparecen al medir ANA en suero. Por lo tanto la medición de ANA en líquido pleural, aparentemente no aporta nada.

Pentraxina 3: Se trata de una pentraxina larga que es producida por leucocitos o células dendríticas. Se ha demostrado que sus niveles están elevados en los derrames paraneumónicos, pero no parecen servir para diferenciar derrames complicados de no complicados (Ozsu *et al* 2013).

Metaloproteinasas de Matriz e Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas: Las metaloproteinasas (MM) son una serie de enzimas proteolíticas, cuya estructura molecular contiene Zinc, que se encargan de la degradación de materiales que componen la matriz celular. Existen al menos 25 tipos, y el papel de alguno ha sido estudiado con profundidad. La MM-9 parece aumentar en derrames más inflamatorios, y el Inhibidor Tisular de MM-1 también parece estar relacionado con los derrames inflamatorios (Robinson *et al* 2003).

Citoquinas relacionadas con la angiogénesis: Existen citoquinas mediadoras e inhibidoras de la angiogénesis cuyo papel en el derrame pleural ha sido valorado en distintos estudios (Ruiz *et al* 2005).

Endostatina: Es una citoquina inhibidora de la angiogénesis. No se han encontrado diferencias significativas de endostatina entre los derrames pleurales de distinta etiología o según el grado de inflamación.

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) o Factor de crecimiento del endotelio vascular: Aumenta la permeabilidad vascular y estimula la angiogénesis. Parece tener un importante papel en la formación del derrame pleural maligno; incluso se han intentado utilizar anticuerpos antiVEGF para el control de derrames pleurales malignos. Esta citoquina parece tener utilidad en la pleurodesis. Sus niveles están más aumentados en los derrames tumorales que en los derrames tuberculosos, y se correlacionan con los niveles de LDH. Podría ser un marcador útil para diferenciar entre exudados y trasudados, ya que sus niveles parecen ser más del doble de media en los exudados (Fiorelli *et al* 2011). Uso investigacional.

Basic Fibroblast Growth Factor (BFGF) o Factor de crecimiento básico de los fibroblastos: Factor pro-angiogénico producido en su mayor parte por las

células mesoteliales cuyos niveles se ven especialmente aumentados en el empiema y los derrames pleurales complicados. Uso investigacional.

#### Moléculas relacionadas con la inflamación

*Platelet Activating Factor* (PAF) o Factor activador de las plaquetas: (Activa las plaquetas, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos, y aumenta la permeabilidad vascular. Se sintetiza por las células mesoteliales en respuesta a la trombina. Uso investigacional.

*Monocyte Chemotactic Peptide 1* (MCP-1) o Péptido quimiotáctico de los monocitos tipo 1: Se encuentra aumentado en pacientes con derrame maligno y tuberculoso en comparación con pacientes con derrame paraneumónico no complicado o cardíaco. Al usar anticuerpos antiMCP-1 se elimina aproximadamente el 70% de la actividad quimiotáctica en el derrame pleural. Uso investigacional (Antony VB *et al* 1993).

*Tumoral Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ) o Factor de necrosis tumoral: Estimula las células mesoteliales para la producción de IL-8, MCP-1 y VEGF. Esta citoquina se relaciona con la inflamación, y diversos estudios apuntan a que puede tener relación con los derrames pleurales loculados y la formación de la loculación. No tiene aplicación clínica (Abbas *et al* 2008).

*Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) o Factor de crecimiento transformante  $\beta$ : Es un potente agente generador de fibrosis, que se ha utilizado para la realización de pleurodesis (Sase *et al* 2003).

Las interleuquinas son un conjunto de citoquinas que son sintetizadas principalmente por los leucocitos, aunque también pueden intervenir las células endoteliales o del estroma del timo o de la médula ósea. Su principal función es regular las funciones de estas células del sistema inmunitario, como la activación, diferenciación o proliferación, la secreción de anticuerpos, la quimiotaxis, la regulación de otras citoquinas y factores, entre otras (Abbas *et al* 2008). Las interleuquinas estudiadas en el líquido pleural son numerosas y tienen acciones variadas en la pleura. Ninguna de ellas se usa de forma

rutinaria en la práctica clínica, porque, aunque sus niveles varían entre el DP de un tipo u otro, suele existir bastante solapamiento en los niveles. Entre ellas destacamos:

Interleuquina 1 (IL-1): Interleuquina proinflamatoria, que juega un importante papel a nivel sistémico como activadora de los linfocitos T, e induce la cascada inflamatoria. Su administración a modelos animales produce una clínica similar al shock séptico. Existen 2 subtipos distintos, la IL-1 $\alpha$ , relacionada fundamentalmente con los linfocitos T, y la IL-1 $\beta$ , secretada por monocitos y macrófagos. La IL-1 $\beta$  estimula las células mesoteliales que secretan Inhibidor de la Activación del Plasminógeno (PAI-1) y TGF- $\beta$ . Es el subtipo que se encuentra más elevado en la pleura generalmente. La IL-1 se eleva más en los derrames tipo empiema, y sus valores son mayores en el derrame tuberculoso que en el maligno. En general se puede decir, que los niveles de IL-1 se encuentran aumentados en los derrames pleurales más inflamatorios. Sin embargo, esta relación no tiene utilidad diagnóstica debido al alto grado de solapamiento de los valores encontrados en estas moléculas. No sorprendentemente se ha encontrado una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de IL-1 y TNF $\alpha$  ambos medidos en líquido pleural (Alexandrakis *et al* 2000).

Interleuquina 2 (IL-2): Induce y mantiene la proliferación de linfocitos T y NK. Debido a su efecto estimulador de los linfocitos NK se ha estudiado su papel antitumoral mediante instilaciones de IL-2 intrapleurales en pacientes con metástasis pleurales, llegándose a conseguir negativización de la citología maligna. Al tratarse de una citoquina proinflamatoria, sus niveles aumentan en los derrames pleurales cuanto mas inflamatorios son. Sus niveles son mayores en los líquidos pleurales secundarios a tuberculosis que en los derrames malignos. La IL-2 tiene una correlación estadísticamente significativa con la IL-4, IL-5, IL-10 y TNF $\alpha$  (Shimokata *et al* 1991).

Interleuquina 3 (IL-3): Se ha descrito una importante relación entre esta interleuquina y la proliferación de eosinófilos tanto a nivel sistémico como a nivel pleural (Nakamura *et al* 1993).

Interleuquina 4 (IL-4): Actúa fundamentalmente sobre los linfocitos Th2 responsables de la inmunidad humoral (en contraposición con la IL-12, que activa los linfocitos Th1 encargados de la inmunidad celular). Parece inhibir la migración celular hacia el espacio intrapleural (Fine *et al* 2003).

Interleuquina 5 (IL-5): Es un potente estimulador de los eosinófilos, más incluso que la IL-3 tanto a nivel sistémico como a nivel pleural (Kalomedinis *et al* 2005).

Interleuquina 6 (IL-6): Es proinflamatoria, con un papel similar en la pleura a la IL-1 (Alexandrakis *et al* 1999).

Interleuquina 7 (IL-7): Es proinflamatoria y tiene un importante papel en la síntesis de los linfocitos T y B. No ha sido medida en la pleura, pero estudios *in vitro* demuestran que podría tener actividad antitumoral combinada con la IL-2 (Chen *et al* 2001).

Interleuquina 8 (IL-8): Relacionada estrechamente con la actividad de los neutrófilos, se encarga de la inhibición de otras interleuquinas proinflamatorias como la IL-1 y el TNF $\alpha$ . En la pleura se produce por las células mesoteliales frente a estímulos inflamatorios y estimula la entrada de neutrófilos en el espacio pleural. Sus cifras son más altas en el exudado que en el trasudado y su nivel más alto se alcanza en los derrames tipo empiema. Existe una correlación entre ella y el número de neutrófilos en el líquido pleural (Pace *et al* 1999).

Interleuquina 10 (IL-10): Tiene un efecto antiinflamatorio potente, encargándose de la inhibición de la IL-1, IL-2, el TNF $\alpha$  y el Interferon  $\gamma$ . A nivel pleural inhibe el tráfico de células inflamatorias hacia la cavidad. Sus niveles están aumentados en los derrames pleurales de etiología tumoral y tuberculosa (Fine *et al* 2003).

Interleuquina 12 (IL-12): Tiene un importante papel en la inmunidad celular, al estimular los linfocitos Th1. Su déficit se ha asociado con la aparición de tuberculosis intrapleural en diversos estudios con ratones *knock-out* para IL-

12. Su medición intrapleural mediante ELISA podría tener valor diagnóstico, ya que los derrames tuberculosos llegan a estar una media de 10 veces más elevados que los derrames malignos (Zhang *et al* 1994).

Interleuquina 13 (IL-13): Estimula la quimiotaxis de eosinófilos al espacio pleural regulando la producción de Eotaxina (Kalomendis *et al* 2005).

Interleuquina 16 (IL-16): Interviene en la quimiotaxis de los linfocitos T, siendo producida a nivel sistémico por los monocitos. Se encarga de estimular la síntesis de citoquinas proinflamatorias como la IL-1, IL-6 y el TNF $\alpha$ . Sus niveles se encuentran aumentados en los derrames tuberculosos comparados con los tumorales. Existe una correlación positiva entre la IL-16 y los niveles de linfocitos T CD4+ en el líquido pleural (Qin *et al* 2005).

## **1.2. LA VITAMINA D Y LAS ENFERMEDADES PLEUROPULMONARES**

### **1.2.1 ASPECTOS GENERALES DE LA VITAMINA D**

El ser humano puede obtener la vitamina D o calciferol de dos fuentes diferentes, de la dieta (en una proporción pequeña) y de la síntesis endógena en la epidermis por el efecto de los rayos ultravioleta (la fuente principal de vitamina D). En este sentido, como en muchos otros que se irán viendo a lo largo de esta presentación, esta vitamina tiene un comportamiento diferente de las vitaminas "clásicas", que, por definición, son absolutamente dependientes de la dieta (Henry 2011). La dieta aporta dos moléculas similares con efecto vitamina D, la vitamina D<sub>2</sub> o ergocalciferol, derivada del ergosterol, que se encuentra en los hongos y levaduras y la vitamina D<sub>3</sub> o colecalciferol que se encuentra en los alimentos grasos de origen animal, entre los que se encuentran fundamentalmente el aceite de hígado de bacalao y los pescados azules salvajes (salmón, caballa, sardina, etc.), mientras que la mantequilla, los derivados grasos de la leche y la yema de huevo contienen pequeñas cantidades. El resto de los alimentos son fuentes muy pobres de esta vitamina, salvo si se enriquecen artificialmente. Hay un cierto desacuerdo en la literatura sobre si el ergocalciferol es biológicamente tan activo como el colecalciferol, pero puesto que en España con mucho la fuente más importante de esta vitamina no es la dieta, sino la radiación solar, se puede identificar la vitamina D con el colecalciferol. En la piel los rayos ultravioleta B (300-325 nm) producen la fotólisis de un precursor del colesterol, el 7 dihidrocolesterol, en previtamina D<sub>3</sub>, que, a su vez, sufre una isomerización térmica espontánea, convirtiéndose en vitamina D<sub>3</sub>. La vitamina D<sub>3</sub> y otros metabolitos inactivos así formados se unen a la proteína transportadora de vitamina D (VDBP), que a través de la sangre distribuye la vitamina a todo el organismo. El efecto de la radiación solar depende de múltiples factores, tanto ambientales (época del año, latitud, altitud, nubosidad, nivel de polución, etc), como específicos del individuo (edad, tipo de piel y de vestimenta, número de horas de insolación, uso y tipo de

cremas protectoras, etc). En Cantabria la intensidad de la radiación es insuficiente para producir vitamina D probablemente durante al menos 6 meses al año (de Octubre a Marzo).

La vitamina D es biológicamente inactiva, ya que para ejercer sus efectos fisiológicos necesita ser hidroxilada dos veces, primero en posición 25 y luego en posición  $1\alpha$ , con lo que se transforma en el 1,25 dihidroxicalciferol o calcitriol, la molécula activa, que a nivel sistémico (endocrino) se comporta como una hormona esencial para el metabolismo fosfocálcico y óseo, y a nivel local (paracrino o intracrino) se comporta como una citoquina reguladora de múltiples funciones celulares (Jones *et al* 2013).

La vitamina D se hidroxila inicialmente en posición 25 en el hígado a través del efecto 25 hidroxilasa que comparten diversas enzimas, de las cuales la más importante es la CYP2R1 microsomal. Esta enzima está poco regulada, de manera que se produce una transformación masiva y directa del calciferol que llega al hígado hacia 25 hidroxicalciferol (25OH vitamina D). La 25OH vitamina D se une a la VDBP y es el principal metabolito circulante, con una vida media aproximada de 2 semanas, lo que la convierte en el principal indicador del estado nutricional en esta vitamina.

La segunda hidroxilación puede ocurrir en el riñón (vía clásica hormonal, relacionada con el metabolismo fosfocálcico) o en otras células no relacionadas con este metabolismo (vía no clásica, con efectos básicamente locales en condiciones fisiológicas). En ambos casos la enzima responsable es la  $1\alpha$  hidroxilasa (CYP27B1) que genera el metabolito activo 1,25 dihidroxivitamina D o calcitriol. La actividad de esta enzima, a diferencia de la 25 hidroxilasa, está fuertemente regulada, y lo que es más importante, la regulación a nivel renal y a nivel de otras células es diferente. La PTH, el calcio, la calcitonina, la hormona de crecimiento y el factor de crecimiento insulinoide tipo I son reguladores positivos de esta enzima en las células tubulares proximales renales, mientras que en estas células el fosfato, el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23), klotho, Memo y el propio calcitriol disminuyen su actividad. El calcitriol a nivel renal induce la actividad de la enzima 24

hidroxilasa (CYP24), que inactiva el calcitriol transformándolo en 1,24,25 trihidroxivitamina D, que es biológicamente inerte. El objetivo final de este complejo entramado hormonal es mantener unos niveles adecuados de calcio y fosfato en sangre, que garanticen un normal metabolismo fosfocálcico y óseo. La vía no clásica de activación de la CYP27B1 se explicará en detalle más adelante, por ser parte fundamental de este trabajo.

La proteína transportadora de la vitamina D (VDBP) fue identificada originalmente mediante electroforesis del suero humano (Hirschfeld 1959). Es una  $\alpha$ -globulina glucosilada con un tamaño cercano a 58 kDa, constituida por 458 aminoácidos, que se produce fundamentalmente en el hígado. Se ha demostrado su presencia no sólo en sangre sino también en líquido ascítico, pleural, cerebroespinal, así como adherida a la superficie de numerosas células. Su gen pertenece a la familia del de la albúmina y se localiza el cromosoma 4q12-q13. Pronto se comprobó que era muy polimórfica y por ello se denominó Globulina Gc o Componente sérico específico de grupo. En 1975 se demostró su función como proteína transportadora de diversos metabolitos de la vitamina D (Dagier *et al* 1975), con lo que alarga la vida media circulante de estos y limita su libre acceso, aunque luego se ha comprobado que, además, tiene muchos otros efectos (captura y secuestra actina muscular, restos de membranas celulares y ácidos grasos circulantes, y hay estudios que le asignan funciones reguladoras específicas en la microcirculación, inflamación, infección, respuesta al cáncer y remodelación ósea). Se ha demostrado que para activar los macrófagos la VDBP debe convertirse en un péptido desglicosilado denominado Gc-MAF o VDBP-MAF (*Vitamin D binding protein-Macrophage activating factor*), hecho que ocurre mediante la acción enzimática de los linfocitos T y B que producen una glucohidrólisis paso a paso que conlleva una pérdida progresiva de fracciones de oligosacáridos de la DBP original.

La VDBP está constituida por dos grandes dominios (I y II) y otro dominio más pequeño en la porción C-terminal (III). Se considera que el dominio I es la zona de fijación de la vitamina D mientras que el dominio III es la zona de fijación de la actina. Ambas funciones son independientes entre sí. El

gen de la VDBP, como ya se ha dicho, es altamente polimórfico, presentando tres variantes comunes (Gc1F, Gc1S y Gc2) y más de 120 variantes infrecuentes. Los SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*) del exón 11 producen las formas más comunes, que tienen diferencias en algunos aminoácidos, que a su vez tienen consecuencias funcionales. Así el SNP rs7041 (Gc1) es el que más se relaciona con los niveles de 25OH vitamina D en sangre, y por otro lado la proteína Gc2 tiene menos capacidad de ser convertida en VDBP-MAF que la variante Gc1 (Chishimba *et al* 2010, Wood *et al* 2011). El papel que puede jugar la VDBP y el VDBP-MAF en la patogenia de algunas enfermedades pulmonares, especialmente la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, se está empezando a analizar (Wood *et al* 2011).

La megalina es un receptor basurero que se expresa abundantemente en el borde en cepillo (luminal) de las células tubulares proximales renales, que captura y recicla una amplia cantidad de proteínas plasmáticas filtradas, entre ellas la VDBP, de manera que juega un papel fundamental en el reciclaje de los metabolitos de la vitamina D, que de otra forma se perderían en la orina. Se discute si la megalina también juega un papel en la entrada del complejo VDBP-metabolitos de la vitamina D en otras células (piel, sistema inmunológico, etc), aunque se sabe que existe en las paratiroides, la placenta, las mamas y algunos tipos de cáncer (Chun *et al* 2013).

La afinidad de la VDBP por los diversos metabolitos de la vitamina D es muy diferente: la mayor afinidad es por las 25OH vitamina D-lactonas, seguida de la propia 25OH vitamina D y sus metabolitos catabólicos, mientras que la 1,25 dihidroxivitamina D tiene una afinidad 10-100 veces menor por la VDBP. La vitamina D auténtica tiene una afinidad todavía mucho menor. La albúmina también tiene capacidad de fijar metabolitos de vitamina y aunque su afinidad es mucho menor que la de la VDBP sus concentraciones en sangre son mucho más altas, de manera que debe contribuir a los niveles totales de 25OH vitamina D circulantes, aunque no se sabe en qué medida. Al igual que con otros esteroides hormonales se postula, en general, que la hormona biológicamente activa es el calcitriol libre, no unido a VDBP ni a la albúmina,

cuya determinación está sujeta a numerosas críticas técnicas en los poquísimos laboratorios que lo han intentado. Alternativamente se han elaborado diversas fórmulas matemáticas para calcularla en función de las concentraciones de VDBP y albúmina, pero su significado es incierto (Chun *et al* 2013).

El calcitriol ejerce sus efectos reguladores fundamentalmente (aunque no de forma exclusiva) a través de la activación de su receptor (mal llamado receptor de la vitamina D o VDR, porque la vitamina D por sí misma no activa el receptor) (Haussler *et al* 2013). El VDR es un miembro de la superfamilia de los receptores nucleares y como estos, posee dos porciones específicas, la aminoterminal que se fija al Ácido Desoxirribonucleico (DNA) y la carboxiterminal que fija el ligando, en este caso el calcitriol. La fijación del calcitriol al VDR es de alta afinidad e induce una heterodimerización del VDR con el receptor X del ácido retinoico. Una vez formado el heterodímero este se fija a elementos de secuencia específicos del DNA (VDREs) que contienen repeticiones directas de motivos PuG(G/T)TCA separados por tres bps (DR3) o repeticiones evertidas separadas por 6 bps (ER6) en la región promotora de los genes que responden a la vitamina D. Dependiendo del gen diana esta fijación atrae diversas moléculas coactivadoras (ej NCoA62/SKIP) o correpresoras (ej HDAC3), de manera que se ensambla un complejo que induce o reprime la transcripción génica mediada por la RNA polimerasa II, con lo cual se sintetizan o dejan de sintetizarse numerosas proteínas dependientes de la vitamina D. Sin embargo, la complejidad de la regulación génica del VDR es cada vez mayor. En este sentido, se ha visto que algunas repeticiones evertidas ER8 también reconocen este receptor activado y regulan la síntesis de interleucina-10 (IL-10), se ha comprobado que el VDR puede regular genes a distancias tan grandes como 75 kb y también se ha demostrado que el VDR activado puede desplazar determinados factores nucleares unidos al DNA, como el NF-AT que activa los linfocitos T, con lo que reprime la expresión de los genes que activa este factor nuclear, en concreto determinadas citoquinas. También se sabe que existe una proteína nuclear que se fija a determinados VDREs (VDRE-BP) con alta afinidad, y ha de ser desplazada por el VDR activado para que este pueda ponerlos en marcha. Finalmente está demostrado que el calcitriol también tiene

efectos rápidos mediados por putativos receptores de membrana, en fase de caracterización.

La presencia de efectos no clásicos del calcitriol-VDR se ha ido fundamentando en los últimos años en base a varios hechos (Christakos *et al* 2011): 1) la demostración de la actividad  $1\alpha$ -hidroxilasa en numerosas células extrarrenales, regulada por mecanismos no hormonales (Tabla 1.3), 2) la demostración de la existencia de VDR en células no relacionadas con el metabolismo del calcio, de tal manera que se cree que hasta el 3% del genoma humano está regulado por el calcitriol (Tablas 1.4. y 1.5.), y 3) la existencia de efectos específicos, mediados por esta señalización, en células no implicadas en el metabolismo del calcio, entre las que se encuentran células del sistema inmunológico, diferentes epitelios, placenta, etc. (Tabla 1.5.), lo que sugiere la posible implicación de esta vía en numerosas enfermedades (Christakos *et al* 2013). Esta vía parece muy primitiva desde el punto de vista evolutivo y la regulación del calcitriol intracelular en las células inmunes no está controlada por la  $24$  hidroxilasa, cuya variante es inactiva en dichas células. Los genes modulados por Calcitriol-VDR en diversos tejidos y tipos celulares se expresan en las tablas 1.6. y 1.7.

TABLA 1.3. Tejidos con expresión extrarrenal de  $1\alpha$ -hidroxilasa y producción de calcitriol

<b>TEJIDOS CON EXPRESIÓN EXTRARRENAL de <math>1\alpha</math>-HIDROXILASA Y PRODUCCIÓN DE CALCITRIOL</b>	
Monocitos/macrófagos	Células dendríticas
Células endoteliales	Epitelio bronquial
Células mesoteliales de la pleura	Cerebro
Mama	Islotes pancreáticos
Paratiroides	Piel (queratinocitos)
Próstata	Colon
Mioblastos, músculo esquelético en regeneración	
Placenta (trofoblastos fetales, células de la decidua maternas)	

TABLA 1.4. Órganos y tejidos que se ha sugerido que expresan receptores para calcitriol

**ÓRGANOS Y TEJIDOS QUE SE HA SUGERIDO QUE EXPRESAN RECEPTORES PARA CALCITRIOL**

**Sistema osteomuscular:** osteoblastos, médula ósea, condrocitos, músculo estriado, músculo liso

**Aparato circulatorio:** Células mioendocrinas atriales, miocardiocitos, células endoteliales

**Aparato digestivo:** parótida, células epiteliales de la boca, estómago, enterocitos, colonocitos, hepatocitos, vesícula biliar

**Riñón y vías urinarias:** células epiteliales tubulares (proximales y distales), urotelio

**Sistema inmunológico:** linfocitos T y B activados, monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células del bazo, del timo, de los ganglios linfáticos

**Aparato reproductor:** Amnios, membrana corioalantoica, células alveolares y ductales de la mama, ovario, oviducto, útero, placenta, epidídimo, células de Sertoli y de Leydig del testículo, próstata, glándula de la cáscara del huevo (gallinas)

**Piel:** epidermis, fibroblastos, folículos pilosos, queratinocitos, melanocitos, sebocitos, glándulas sebáceas

**Sistema nervioso:** encéfalo (hipocampo, células de Purkinje y granulares del cerebelo, *stria terminalis*, núcleo central de la amígdala), ganglios sensoriales, médula espinal, plexos coroideos, glándulas lagrimales, retina

**Sistema endocrino:** tejido adiposo, suprarrenal (corteza y médula), células  $\beta$  del páncreas, hipófisis, tiroides (células foliculares, células C), paratiroides

**Células tumorales:** melanoma, leucemia mieloide, linfoma de células B, mama, próstata, estómago, colon, carcinoma de células escamosas, carcinoma de endometrio

**Aparato respiratorio:** pulmón, epitelio del tracto respiratorio

TABLA 1.5 Tejidos humanos con receptores claramente definidos para Calcitriol.

<b>TEJIDOS HUMANOS CON RECEPTORES CLARAMENTE DEFINIDOS PARA CALCITRIOL (Wang et al 2012)</b>	
Intestino delgado (epitelio)	+++++
Paratiroides (epitelio)	+++++
Túbulo distal renal (epitelio)	+++++
Osteoblastos	+++++
Intestino grueso (epitelio)	+++++
Timo (epitelio)	+++++
Bronquio (epitelio)	+++++
Próstata (epitelio)	++++
Mama (epitelio)	++++
Páncreas (células $\beta$ )	+++
Hipófisis (epitelio)	+++
Túbulo proximal renal (epitelio)	++
Testículos (células germinales)	++
Bazo/ganglios linfáticos (monocitos, macrófagos, células T)	++
Glomérulo (podocitos)	+
Condrocitos	+
Células alveolares pulmonares	-
Sistema muscular	-
Tiroides	-
Suprarrenales	-
Hígado	-

TABLA 1.6. Genes regulados por Calcitriol-VDR en diversos tejidos y tipos celulares animales.

<b>GENES REGULADOS POSITIVAMENTE POR CALCITRIOL-VDR EN DIVERSOS TEJIDOS Y TIPOS CELULARES ANIMALES</b>	
Aldolasa nervios)	NGF (Factor de crecimiento de los nervios)
ASAP2	Polipéptido activador de los neutrófilos
Fosfatasa alcalina	Osteocalcina o BGP (rata, humana)
ATP sintetasa	Osteopontina o SPP1 (murina)
Calbindina D9 kDa humana)	24 hidroxilasa o CYP24A1 (murina, humana)
Calbindina D28 kDa	CYP3A4 (ratón, humana)
Anhidrasa carbónica humano)	Receptor del calcitriol o VDRP (murino, humano)
CCR10 (humana) (humano)	PCFT (transportador de folatos)
Subunidades I, II y III de la Citocromo c oxidasa	PLD1 (humana)
Fibronectina membrana	Proteínas de la bomba de calcio de la membrana
c-Fms	Prolactina
c-Fos	Proteína-cinasa C
hCBS (cistationina-β hidroxilasa) (humana)	TNF-α (Factor de necrosis tumoral- α)
Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa	Catelicidina o LL-37 (solo humana)
HLA-DRB1 (humana)	β-2 Defensina
HSP70 (Proteína de choque térmico 70)	Claudinas 2 y 12
IGFBP3 (humana)	TRPV6 (humana)
Integrinas α, β, γ	LRP5 (murina)
Insig2 (ratón)	RANK-L (murina)
Involucrina (humana)	FGF23
Receptor interleucina 3	Klotho

TABLA 1.7. Genes regulados por calcitriol-VDR en diversos tejidos y tipos celulares

<b>GENES REGULADOS NEGATIVAMENTE POR CALCITRIOL-VDR EN DIVERSOS TEJIDOS Y TIPOS CELULARES ANIMALES</b>	
ATP sintetasa renal	Calcitonina
CD23	Colágeno tipo 1
Citocromo b	GM-CSF
Subunidades I, II y III de la Citocromo c oxidasa renal	ICAM-1
Proteína fijadora de los ácidos grasos	Ferridoxina
Histona H4	Interferón $\gamma$
Interleuquina 2	c-Myb
c-Myc (en algunas células)	Subunidad I de la NADH deshidrogenasa
PTH	Inhibidor de la proteína-cinasa renal
PTH-RP (rata)	SOSTDC1 (humana)
Receptor de la transferrina	$\alpha$ -tubulina
Cadherina 17	PHEX
RUNX2 (ratón)	OPG (Osteoprotegerina)

### **1.2.2. PAPEL DE LA VITAMINA D EN EL SISTEMA INMUNOLÓGICO**

La señalización a través del sistema calcitriol-VDR induce potentes efectos inmunomoduladores, básicamente antiinfecciosos y antiautoinmunitarios, tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa, cuya enorme complejidad comienza a ser desentrañada en la actualidad (Hewison 2012, Adams *et al* 2012, Prietl 2013).

Desde la antigüedad ya se intuía que el sol podría tener un efecto beneficioso, como atestiguan los tratamientos de helioterapia para la tisis indicados por Hipócrates. La asociación entre raquitismo por deficiencia de vitamina D e infecciones ya se señalaba también en las primeras descripciones

del siglo XVII. A mitad del siglo XIX, en plena época preantibiótica se empezó a aconsejar el uso de aceite de hígado de bacalao (una fuente excelente de vitaminas A y D) no sólo para tratar el raquitismo sino también para la tuberculosis pulmonar (entonces llamada tisis o consunción pulmonar) (Williams 1849) y poco después se puso de moda el tratamiento de esta enfermedad mediante helioterapia en los clásicos sanatorios, soleados, y separados de las zonas con alta polución. En 1903 Niels Finsen recibió el Premio Nobel de Medicina por demostrar que la luz ultravioleta podía curar la tuberculosis cutánea (llamada entonces lupus vulgaris). En 1946 Raab propuso la utilización de vitamina D intrapleural para tratar el empiema (Raab *et al* 1946).

A partir de 1980 se produce toda una serie de descubrimientos que empiezan a identificar las bases moleculares de la relación entre la vitamina D y la respuesta inmune:

Se demuestra la existencia de producción extrarrenal de calcitriol en los granulomas sarcoidóticos de un paciente anéfrico hipercalcémico (Barbour *et al* 1981).

Entre 1981 y 1983 Abe *et al* comprueban que el calcitriol promueve la fusión de macrófagos alveolares de ratón, a través de un doble mecanismo, directo e indirecto. Esta es la primera demostración de un efecto del metabolito activo de la vitamina D sobre células del sistema inmune (Abe *et al* 1981, Abe *et al* 1983). Curiosamente ese mismo año 1983 Proveddini *et al* identifican la presencia de receptores para calcitriol en leucocitos humanos y Bhalla *et al* hacen el mismo hallazgo en monocitos y en linfocitos T activados (Proveddini *et al* 1983, Bhalla *et al* 1983).

En 1986 se evidencia que la vitamina D y el interferón- $\gamma$  son capaces de controlar la proliferación del *Mycobacterium tuberculosis* en monocitos humanos (Rook *et al* 1986). Posteriormente se confirman estos datos al encontrar que el calcitriol inhibe la multiplicación de bacilos tuberculosos virulentos en macrófagos humanos en cultivo (Crowle *et al* 1987). Ese mismo año se demuestra la existencia de receptores de calcitriol en las células

dendríticas humanas (Brennan *et al* 1987). Posteriormente, se demuestra que el líquido del DP tuberculoso humano contiene algo que potencia la actividad  $1\alpha$ -hidroxilasa de la 25OH vitamina D en los macrófagos de los pacientes con sarcoidosis activa y sugieren que puede ser el interferón- $\gamma$  (Adams *et al* 1989).

Para que se empezase a entender el mecanismo molecular de acción del calcitriol sobre los bacilos tuberculosos tuvieron que transcurrir casi otros 20 años más. En 2004 el grupo de White (Wang *et al* 2004) demostró que el calcitriol tenía la capacidad de inducir la expresión génica de los péptidos antimicrobianos humanos catelicidina (también denominada LL-37) y  $\beta$ -2-defensina (HBD2). Finalmente en 2006 un estudio seminal de Liu *et al* demostró que el reconocimiento de antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* por parte de los Receptores *Toll-Like 2/1* (TLR2/1) de los monocitos o de células relacionadas con la inmunidad innata (piel, epitelio respiratorio, digestivo, urinario, etc.) inducía la activación de los genes de la  $1\alpha$ -hidroxilasa y del VDR, lo que llevaba a su vez a la activación de los genes codificadores de las moléculas secretorias con efecto antibiótico antes mencionadas (Liu *et al* 2006, Campbell *et al* 2012). El promotor del gen de ambas moléculas contiene al menos un elemento de respuesta al receptor del calcitriol (VDRE), que curiosamente en el caso de la catelicidina se localiza en una pequeña secuencia nuclear intercambiable que sólo aparece en el ser humano y los primates superiores, lo cual sugiere que la regulación por vitamina D de esta faceta de la inmunidad innata es un hecho evolutivamente reciente, casi exclusivamente humano, de manera que los estudios experimentales en animales inferiores no son extrapolables al ser humano (Gombart *et al* 2009). Liu *et al* demostraron que para que se produjese una adecuada liberación de LL-37 y  $\beta$ -2-defensina se necesitaban unos niveles normales de vitamina D en el medio, de manera que la hipovitaminosis D limitaba la liberación de dichas sustancias. Los pasos intermedios por los cuales la activación de los TLR 2/1 estimula la síntesis de calcitriol y su receptor se empiezan a conocer. En el ser humano se ha descrito la existencia de una cascada enzimática intracelular, modulada a su vez por citocinas extracelulares estimuladoras (IL-1, IL-15, interferón- $\gamma$ ) e inhibitoras (IL-4, IL-10) (Vandamme *et al* 2012).

TABLA 1.8. Agentes biológicos sensibles al efecto del eje vitamina D-Antibióticos vitamina D dependientes (Vandamme *et al* 2012, modificado y actualizado a 2014).

**AGENTES BIOLÓGICOS SENSIBLES AL EFECTO DEL EJE VITAMINA D-ANTIBIÓTICOS VITAMINA D DEPENDIENTES (Efectos antibacterianos claros)**

**(Vandamme et al 2012, modificado y actualizado a 2014)**

<i>Mycobacterium tuberculosis, M. leprae, M. bovis</i>	<i>Borrelia spp</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Nocardia spp.</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Capnocytophaga spp.</i>
<i>Aggregatibacter actinomycetumcomitans</i>	<i>Brucella suis</i>
<i>Burkholderia pseudomallei, B. cepacia, B. thailandensis</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Franciscella novicida</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Leptospira interrogans</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>
<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Shigella sp.</i>
<i>Porphyromonas gingivalis, P. circumdentaria</i>	<i>Salmonella sp.</i>
<i>Prevotella intermedia, P. loescheii, P. melanogenica</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
<i>Treponema pallidum, T. denticola</i>	<i>Malassezia furfur</i>
<i>Yersinia pestis</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes</i>	Adenovirus
Citomegalovirus	HIV-1
Virus del Papiloma Humano	Virus de la influenza
Virus vacuna	Virus del herpes simple 1
Virus varicela zoster	

Tabla 1.8. Continuación

**AGENTES BIOLÓGICOS INSENSIBLES AL EFECTO DEL EJE VITAMINA D-ANTIBIÓTICOS VITAMINA D DEPENDIENTES (Sin efecto antibacteriano)**

**(Vandamme et al 2012, modificado y actualizado a 2014)**

*Entamoeba histolytica* (aunque activa la secreción de catelicidina)

*Salmonella typhi* y *Salmonella typhimurium*

**AGENTES BIOLÓGICOS FAVORECIDOS POR EL EFECTO DEL EJE VITAMINA D-ANTIBIÓTICOS VITAMINA D DEPENDIENTES (con efectos negativos de la vitamina D)**

**(Vandamme et al 2012, modificado y actualizado a 2014)**

*Toxoplasma gondii*

*Leishmania donovani*

Evidentemente los efectos inmunológicos de los derivados de la vitamina D no se limitan a la inmunidad innata, sino que también regulan muchos aspectos de la inmunidad adaptativa, en los que no entraremos por no ser motivo de este trabajo (Hewison 2012, Prietl 2013, Chun *et al* 2014).

### **1.2.3. ANTIBIÓTICOS HUMANOS VITAMINA D DEPENDIENTES**

La catelicidina y las defensinas forman parte de un grupo de polipéptidos catiónicos pequeños multifuncionales, evolutivamente muy primitivos, con efectos antimicrobianos potentes, capaces de destruir bacterias, hongos y virus. En la tabla 1.8. se indican los microorganismos sensibles al efecto del eje vitamina D-Antibióticos vitamina D dependientes. Los efectos de estos

polipéptidos, incluyen además muchas otras funciones (actividad quimiotáctica, inhibidora de proteasas, angiogénica, promotora de la síntesis de matriz extracelular, activadora de la proliferación o de la autofagia de determinadas células, etc.) (Teclé *et al* 2010, Pinheiro da Silva *et al* 2012). Estas sustancias se engloban dentro de las “alarminas” (moléculas que median la señal de alarma del organismo) (Chan *et al* 2012). Las alarminas son una serie de moléculas endógenas multifuncionales, estructural y evolutivamente diferentes (que incluyen además la HMGB1, algunas proteínas S100A y B y algunas proteínas de choque térmico -HSP60 y 70-), que pueden ser liberadas pasivamente por células necróticas o ser secretadas rápidamente por leucocitos o epitelios activados. Una vez liberadas a la sangre, las alarminas producen activación de las células del sistema inmune innato, modulan el sistema inmune adaptativo y finalmente, al superarse el problema desencadenante de la inflamación, ponen en marcha los mecanismos de reparación tisular.

#### **1.2.3.1. La catelicidina humana o LL-37**

En 1991 Larrick *et al* identificaron, purificaron y clonaron el gen de una proteína antimicrobiana catiónica de 18 kDa, que denominaron CAP-18, en el conejo, que tenía la propiedad de fijar lipopolisacáridos bacterianos y abrieron el camino para que en 1995 tres grupos distintos (Larrick *et al*, Cowland *et al*, Agerberth *et al*) identificaran la única catelicidina humana o LL-37, una proteína antibiótica derivada de una molécula precursora mucho mayor, la procatelicidina (hCAP-18). Ese mismo año 1995 el grupo de Zanetti acuñó por primera vez el término catelicidina.

La preprocatelicidina se caracteriza, como muchos precursores de proteínas secretorias, por poseer un péptido señal aminoterminal, al que sigue un dominio catelina altamente conservado (de ahí la primera parte del nombre de la molécula) y un péptido carboxiterminal catiónico estructuralmente muy variable, con efectos antimicrobianos amplios. La molécula está codificada en el ser humano en un único gen, localizado en el cromosoma 3p21.3, que, como ya se ha dicho, está regulado, entre otros moduladores, por el VDR en el ser humano. Otros mamíferos como el cerdo o la vaca presentan diversos genes de

diferentes catelicidinas. La catelicidina humana madura (porción catelina más porción carboxiterminal) se llama también LL-37 (péptido de 37 aa de 4,3 kDa, que inicia con los aminoácidos Leucina-Leucina, de ahí el acrónimo LL, cuya secuencia es LLGDDFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPTES). La catelicidina se produce en numerosos tejidos (Tabla 1.9.), especialmente en las células inmunes (Lowry *et al* 2014) y es detectable en sangre, orina y diversos líquidos biológicos.

Tabla 1.9. Células y tejidos que producen catelicidina.

<b>CÉLULAS Y TEJIDOS QUE PRODUCEN CATELICIDINA</b>
Médula ósea
Granulocitos (depósito)
Monocitos/macrófagos
Mastocitos
Placenta
Piel (queratinocitos, células de las glándulas sudoríparas)
Células epiteliales: ojos, glándulas lagrimales, nariz, cavidad oral, células gingivales, glándulas salivares, tracto digestivo, células de Paneth, tracto genitourinario, tracto respiratorio
Glándula mamaria
Células cancerosas (melanoma, leucemia mieloide, linfoma de células B, mama, próstata, estómago, colon, c. de células escamosas, endometrio, ovario, mama, pulmón) (varía según las líneas celulares)

La catelicidina es medible en casi todos líquidos biológicos humanos estudiados, pero debe tenerse en cuenta que los pocos resultados publicados son muy distintos según el líquido estudiado, según el método utilizado para medir esta molécula y según se trate de líquidos fisiológicos o patológicos, lo que complica la interpretación de los resultados.

Se supone que los niveles de catelicidina de los líquidos biológicos en una persona sana expresan la secreción basal, constitutiva, del péptido en la médula ósea, los neutrófilos, mastocitos, células NK y otras, mientras que en

los pacientes con infecciones, traumatismos etc., esta cifra se ve aumentada por la secreción inducida por la activación del sistema TLR 2/1-VDR en las células responsables de la inmunidad innata (Lowry *et al* 2014), aunque los datos que demuestren esto *in vivo* en humanos son muy escasos. Se supone también que a igualdad de estímulo antigénico la respuesta de catelicidina es inferior *in vivo* en los pacientes con hipovitaminosis D, aunque esto hasta ahora solo se ha valorado en estudios *in vitro*, como ya se ha comentado previamente. Sin embargo todo lo dicho no deja de ser una simplificación, ya que la expresión de catelicidina *in vitro* e *in vivo* está influida por numerosos factores, tanto positivos como negativos (Campbell *et al* 2012). Son factores positivos los agonistas de los receptores TLR (bacterias, virus, butirato sódico), los agonistas del receptor de la vitamina D (calcitriol y otros derivados activos, por ej el paricalcitol, e incluso quizás la propia 25 OH vitamina D), el IFN- $\gamma$ , los agentes que producen estrés del sistema retículo-endoplásmico, algunos componentes de la dieta (la curcumina, el resveratrol etc), el leucotrieno B<sub>4</sub>, el ligando de CD40, el TNF $\alpha$ , la IL-17 A y el daño tisular. Son factores negativos determinadas endotoxinas bacterianas, la *Shigella*, el estrés psicológico (probablemente a través de los glucocorticoides), la nicotina, la senescencia (en algunos modelos) y la IL-6, entre otros. A todo ello debe sumarse el hecho de que la respuesta es variable de unos tejidos a otros. La respuesta *in vivo* depende de la influencia combinada de todos estos factores y por ello el resultado secretorio final en el líquido biológico a considerar es mucho más impredecible en el humano enfermo que en cualquier modelo experimental, donde se pueden controlar estos factores.

En un trabajo recientemente publicado (Tiosano *et al* 2012) los autores utilizaron muy elegantemente el modelo de los pacientes con raquitismo vitamina D resistente por mutación del VDR para demostrar que estos monocitos en los que no se produce señalización a través del receptor clásico de la vitamina D expresan basalmente menos niveles de catelicidina y que su capacidad de respuesta tras estimulación con 25OH vitamina D es mucho menor que la de los monocitos de sujetos sanos. Este dato resalta el papel del VDR, pero también indica que otros factores independientes de la vitamina D

pueden liberar catelicidina de forma eficiente, ya que en ausencia de señalización a través del VDR las células son capaces de producirla tanto basalmente como tras estímulos variados, lo que indica que el calcitriol es un modulador positivo de secreción de catelicidina, pero no el único.

Las concentraciones de LL-37 han sido medidas en diversos líquidos biológicos en el ser humano, aunque la sangre ha sido la más extensamente estudiada.

En 1997 Sorensen *et al* publicaron el primer trabajo en el que se presentaban resultados de LL-37 en plasma medidos mediante un ELISA propio. Las cifras eran de  $1180 \pm 200$  ng/ml en controles sanos. No encontraron diferencias entre plasma y suero, ni entre hombres y mujeres, ni con la edad (Sorensen *et al* 1997).

En 2005 Xiao *et al* utilizando asimismo un ELISA propio encontraron niveles de  $966 \pm 980$  ng/ml en pacientes con fibrosis quística estable, de  $1137 \pm 685$  ng/ml en pacientes con fibrosis quística asociada a infección bronquial y de  $1012 \pm 648$  ng/ml en sujetos control (no diferentes entre sí) (Xiao *et al* 2005).

En 2009 Adams *et al* con otro ELISA propio situaron los niveles normales entre 220 y 1210 ng/ml, según se ve en la figura publicada, ya que no daban números en su artículo (Adams *et al* 2009). En 2009 Jeng *et al* utilizando el kit de ELISA de Hycult encontraron cifras de  $13,7 \pm 2,1$  y  $10,6 \pm 1,4$  ng/ml en pacientes en cuidados intensivos con y sin sepsis (no diferencias significativas), mientras que en sujetos normales fue de  $27,2 \pm 4,9$  ng/ml (elevadas respecto a ambos). En este trabajo se detectó una correlación positiva significativa entre los niveles de 25 OH vitamina D y LL37 en los pacientes con sepsis (Jeng *et al* 2009). Sin embargo en 2010 Berkestedt *et al* no demostraron diferencias en la concentración de catelicidina entre pacientes con sepsis y controles (Berkestedt *et al* 2010).

En 2010 Yamshchikov *et al* utilizando el kit de ELISA de Hycult encontraron unos niveles de  $49.5 \pm 23.8$  ng/ml, con un rango 8.2-111.2 ng/ml

en 95 pacientes con tuberculosis, aunque ellos mismos señalaron que se trataba de un *freeze research* con muestras congeladas de estudios previos, cuyas cifras deberían ser valoradas con precaución (Yamshchikov *et al* 2010). También en 2010, Jiang *et al* utilizando el kit de ELISA de Hycult publicaron los siguientes resultados: sanos no fumadores 0,47 +/- 0,18 ng/ml, sanos fumadores 0,51 +/- 0,16, EPOC grados I y II 0,46 +/-0,14 ng/ml, EPOC grados III y IV 0,49 +/- 0,14 ng/ml (Jiang *et al* 2010). Ese mismo año Matzner *et al* utilizando un ELISA propio encontraron en enfermos leproso tratados una mediana de 98, con un rango 36 a 167 ng/ml, en aquellos con lepra no tratada una mediana de 48, con un rango de 21 a 266 ng/ml y en controles sanos una mediana de 160, con un rango de 65 a 249 ng/ml (estadísticamente niveles bajos en pacientes con lepra, siendo los niveles más bajos en los pacientes con enfermedad de desarrollo muy reciente) (Matzner *et al* 2010). Por su parte Kanda *et al* mediante el kit de ELISA de Peninsula Labs encontraron cifras de 970±1411 ng/ml en psoriásicos y de 741±1321 ng/ml en normales, siendo las cifras estadísticamente mayores en los psoriásicos, aunque con una enorme dispersión en ambos grupos. Los niveles en suero no bajaban en los pacientes tratados con ciclosporina (Kanda *et al* 2010). Havelka *et al* no encontraron correlación entre los niveles de catelicidina y 25 OH vitamina D en mujeres antes del parto ni en sus hijos, aunque existía una potente correlación entre los niveles de catelicidina en sangre materna y en la del cordón umbilical, pese a la gran dispersión de los resultados (kit de Hycult) (Havelka *et al* 2010)

En 2011 Bhan *et al* utilizando un ELISA propio establecieron como niveles normales una mediana de 698 ng/ml con un rango intercuantílico entre 594 y 903 en un grupo de 60 sujetos sanos. Tras la administración de vitamina D a un subgrupo de 25 sujetos observaron que los que pertenecían al tercil con mayor elevación de los niveles de 25OH vitamina D tenían una mayor elevación en las cifras de catelicidina que los que pertenecían al tercil con menor respuesta, pero ninguno de ellos se diferenciaba de los del tercil intermedio. Leow *et al* reportaron cifras de 69 (13-263) ng/ml (mediana y rango), utilizando el kit de Hycult, en sujetos con neumonía adquirida en la comunidad (Bhan *et al* 2011).

En 2012 un estudio de Dixon *et al* comprobó en un pequeño número de adultos sanos que existía una correlación positiva entre los niveles de 25OH vitamina D y catelicidina en los sujetos con niveles bajos del marcador nutricional de la vitamina D, que sin embargo no se apreciaba en los sujetos con niveles normales (Dixon *et al* 2012). Este trabajo no especifica numéricamente las cifras de LL-37, pero no parece haber diferencia entre los sujetos con 25OH vitamina D por encima o debajo de 32 ng/ml (que es el curioso punto de corte que utilizan para separar a los sujetos estudiados). Los autores indican que en dos trabajos previos de ellos mismos no encontraron correlación entre los niveles del marcador nutricional de vitamina D y la catelicidina en pacientes en diálisis (Gombart *et al* 2009) ni en pacientes que acudían a una clínica especializada en enfermedades metabólicas óseas (Adams *et al* 2009). Estos autores midieron la catelicidina mediante un ELISA propio en todos los estudios. También en 2012 el grupo de Santander (Alvarez-Rodriguez *et al* 2012) comprobó que en ancianos sanos aquellos con mayores cifras de 25OH vitamina D tenían niveles más altos de catelicidina (kit de Hycult). En ese mismo año el estudio de Lehouck *et al* no evidenció correlación significativa entre el estado nutricional en vitamina D y los niveles de catelicidina medida por el ELISA de Hycult ni antes ni después de una suplementación con altas dosis de vitamina D en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Otros estudios posteriores no han encontrado relación entre la catelicidina sérica y la edad (Castañeda-Delgado *et al* 2013) o el estado nutricional en vitamina D (Das M *et al* 2014) en sujetos sanos.

En 2013 He *et al* encontraron niveles más altos de catelicidina en atletas sanos en el tercil más alto de concentración de 25OH vitamina D que en el tercil más bajo, aunque no eran diferentes de los del tercil medio. Además se apreció una correlación positiva significativa ( $p=0,036$ ) entre los niveles plasmáticos de 25OH vitamina D y catelicidina, aunque la  $r$  fue baja (0,234) (He *et al* 2013). Este mismo año Barbeiro *et al* encontraron que los niveles de catelicidina estaban bajos en el shock séptico y no se relacionaban con los niveles del marcador de vitamina D (Barbeiro *et al* 2013).

En resumen las concentraciones de catelicidina medidas en sangre varían dependiendo del método, tienen una dispersión importante no relacionada con el sexo o con el hecho de hacer la determinación en suero o plasma, y su correlación con los niveles simultáneos de 25OH vitamina D o no existe o es pequeña en sujetos sanos, excepto en aquellos que tienen hipovitaminosis D, y no existe en las diversas patologías estudiadas. La información de que se dispone en la actualidad respecto a los niveles de catelicidina en sangre y las infecciones agudas, las exacerbaciones infecciosas de procesos crónicos como el EPOC o la sepsis es fragmentaria y contradictoria.

El líquido biológico que presenta niveles más elevados de LL-37 es el semen (aproximadamente 70 veces mayor que en sangre) (Sorensen 2000). También se ha demostrado la presencia de LL-37 en el líquido vaginal, en el sudor, en la saliva, en el líquido crevicular, en las lágrimas, en el moco nasal, en el esputo, inducido o no, en la leche, y en la orina, entre otros.

La mayoría de los efectos antimicrobianos directos de la LL-37 se atribuyen a su estructura  $\alpha$ -helicoidal y a sus propiedades catiónicas e hidrofóbicas (Burton *et al* 2009). La hélice N-terminal se relaciona con la quimiotaxis, con la propiedad de oligomerización del péptido, con la resistencia a la proteólisis y con su actividad hemolítica, mientras que la hélice C-terminal es responsable de los efectos antimicrobianos, anticancerosos y antivirales. La LL-37 alcanza la membrana microbiana y recubre su superficie como una alfombra, que causa la formación de pequeños poros en la membrana y subsiguiente destrucción de la bacteria. La LL-37 se fija básicamente a las membranas celulares que contienen lipopolisacáridos (Gram -) o ácido teicoico (Gram +) con carga negativa, diferentes de las membranas zwitteriónicas de los eucariotas, con una única excepción, la membrana de los eritrocitos, que contiene ácido siálico, por lo que en concentraciones muy altas produce hemólisis *in vitro*. Los efectos anti *Pseudomonas aeruginosa* de la LL-37 se deben a que previene e incluso destruye el *biofilm* característico de esta bacteria, lo que impide su desarrollo. La acción antifúngica de la LL-37 también se caracteriza por la formación de poros en la membrana. La acción antivírica

se debe asimismo a interacción con la envoltura de la membrana y la cápside proteica. También se ha demostrado que es capaz de fijar a la transcriptasa inversa de HIV-1 y bloquear su acción.

Otro aspecto muy interesante del mecanismo antibacteriano de la catelicidina explica la capacidad que tiene este péptido de destruir patógenos intracelulares, ya que induce autofagia en los monocitos/macrófagos humanos a través de la activación de la transcripción de los genes *Beclin-1* y *Atg5*. Se ha comprobado que en la sepsis grave el LL-37 de los neutrófilos migra al núcleo. El significado de este fenómeno se está investigando, ya que parece modular más aspectos de la transcripción génica (Pinheiro da Silva *et al* 2013). La catelicidina además induce la colocalización de los autofagosomas con fagosomas bacterianos estables (por ej de *Mycobacterium tuberculosis*), liberando las enzimas lisosómicas con lo que destruye los gérmenes intracelulares, que de otra manera podrían mantenerse vivos indefinidamente en el interior de estas células (Yuk *et al* 2009, Shin *et al* 2010).

Como ya se ha dicho, la catelicidina humana tiene muchos otros efectos, aparte de los descritos, que además pueden variar de acuerdo con la dosis que se alcanza a nivel local (Bucki *et al* 2010, Duplantier *et al* 2013). Se ha comprobado in vitro que a dosis inferiores a 1  $\mu\text{mol}$  induce la quimiotaxis y supervivencia de los neutrófilos (inhibe su apoptosis), estimula la angiogénesis y la migración y proliferación de los fibroblastos (efectos beneficiosos para la curación de las heridas), mientras que a concentraciones muy altas, en general más allá de las que se alcanzan en la respuesta fisiológica, tiene efectos citotóxicos (aumenta la apoptosis de determinadas células) y proinflamatorios, probablemente poco beneficiosos, aunque esto solo se ha demostrado en situaciones experimentales y en el shock séptico (Barbeiro *et al* 2013). La LL-37 actúa activando el receptor FPRL-1 (*formylated proteins receptor-like type 1*), un receptor de la superficie células acoplado a las proteínas G, que produce quimiotaxis de los neutrófilos, monocitos y linfocitos T, en los que además se restringe la apoptosis. La LL-37 interactúa también directamente con el lipopolisacárido de las bacterias Gram – reduciendo su enlace a la LBP, MD2 y

otros componentes del complejo del receptor de TLR4, limitando la activación de esta vía. Así se sabe que inhibe la translocación de diversas subunidades del sistema NF- $\kappa$ B y modula selectivamente la transcripción génica de ciertos genes proinflamatorios (Duplantier *et al* 2013). Por tanto sus efectos moduladores en la respuesta antimicrobiana son extremadamente complejos, directos e indirectos, diferentes según la dosis y el tipo celular estudiado, y posiblemente varían según la evolución del proceso. Finalmente el LL-37 también juega un importante papel en la fase de cicatrización de las heridas, ya que estimula la fase reparativa activando el receptor del EGF (*epidermal growth factor*) y del IGF-1 (*insulin-like growth factor type 1*), entre otros (Duplantier *et al* 2013).

### **1.2.3.2. Las defensinas: La $\beta$ -2-defensina o HBD-2**

Las defensinas son un grupo de agentes antimicrobianos evolutivamente muy primitivos que aparecen no sólo en los animales sino también en las plantas e incluso en los hongos. Se han identificado al menos 300 distintas (Cederlund *et al* 2011, Jarczak *et al* 2013). El término "defensinas" fue acuñado por el grupo de Lehrer (Ganz *et al* 1985). Todas ellas contienen seis residuos cisteína que forman típicos enlaces disulfuro (-S-S-). Variando la alineación de los puentes disulfuro y las estructuras moleculares se obtienen las distintas familias de defensinas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\theta$ ). Las últimas no están presentes en nuestra especie.

El ser humano tiene seis  $\alpha$ -defensinas codificadas todas ellas a partir de un locus en el cromosoma 8p23.1. Las  $\alpha$ -defensinas se llaman también HNPs (*human neutrophil peptides*) 1-6, de las cuales la 1 a 4 se encuentran en altas concentraciones en los gránulos primarios azurófilos de los neutrófilos, de donde se liberan cuando hay un proceso inflamatorio, mientras que las 5 y 6 se localizan en las células de Paneth en las criptas del intestino delgado. Las  $\beta$ -defensinas o HBDs (*human  $\beta$ -defensins*) contienen tres enlaces bisulfuro que se sitúan en las posiciones 1-5, 2-4 y 3-6. Se conocen al menos 4 diferentes en el ser humano, de las cuales sólo la HBD-2 está modulada por el VDR. Las HBDs se expresan en diversas células inmunológicas (monocitos, macrófagos, células dendríticas) y epiteliales, la HBD1 de forma constitutiva, mientras que la

secreción de las HBD2 y 3 está estimulada por determinados productos bacterianos (lipopolisacáridos, ácido lipoteicoico) y por las citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ ). La secuencia de la HBD2 es DPVTCLKSGAICHVPFCPRRRYQKIGTCGLPGTKCCKKP. Se han utilizado otras denominaciones alternativas para esta defensina que pueden ser confusas (DEFB4 o DEFB2 según la numeración OMIM 602215). Se trata de un péptido catiónico pequeño (38 aa., de 4.1 kDa), cuyo gen, denominado DEFB4A (según la denominación del HGNC) fue localizado por Harder *et al* en el cromosoma 8p23.1-p22, en el *cluster* de las defensinas en 1997 y la proteína fue caracterizada por Bals *et al* en 1998, precisamente en el pulmón humano (Bals *et al* 1998). Estos autores también identificaron un péptido precursor del anterior, de 41 aa (secuencia GIG previa). El péptido se expresaba de mayor a menor cantidad en el pulmón, timo, piel, riñón, estómago, intestino delgado, leucocitos, hígado y tráquea. Ese mismo año (1998) Singh *et al* demostraron que la HBD1 se producía de forma constitutiva en el epitelio sano de las vías aéreas humanas, mientras que la HBD2 se producía fundamentalmente en respuesta a la inflamación (Singh *et al* 1999).

Wang *et al* demostraron que el calcitriol provocaba la liberación de HBD2, de modo similar, aunque en menor proporción, que la de catelicidina (Wang *et al* 2004). La inducción plena del gen de la HBD-2 exige la convergencia de las vías de la IL-1 $\beta$  y del calcitriol (Liu *et al* 2009). Por otra parte se ha demostrado que la activación del receptor intracelular NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain protein 2*) por su ligando MDP (*muramyl dipeptide*), un producto derivado del catabolismo lisosómico de los peptidoglicanos de bacterias tanto Gram + como -, induce la expresión del gen de HBD2 (Voss *et al* 2006). Más recientemente se ha comprobado que el calcitriol induce de forma robusta la expresión del receptor NOD2 en células monocíticas y epiteliales humanas, de manera que potencia la expresión de la HBD2 (Wang *et al* 2010). Se conocen otros mecanismos de activación de HBD2 como el butirato, el sulforafano de las crucíferas o una hierba medicinal tradicional japonesa llamada hochuekkito, mientras que el ácido retinoico inhibe su expresión en queratinocitos normales, el humo de tabaco bloquea su

producción en el epitelio respiratorio y el resveratrol disminuye su síntesis en células epiteliales pulmonares infectadas *in vitro* con *Pseudomonas aeruginosa* (Campbell *et al* 2012).

Todas ellas tienen actividad antimicrobiana de amplio espectro y al igual que la catelicidina también regulan la inflamación y la reparación tisular. En muchos aspectos pueden ser redundantes, pero tienen efectos potenciadores entre sí y con otros mediadores de la inmunidad innata y adaptativa.

Existen pocos trabajos en los que se hayan medido los niveles de  $\beta$ -2-defensina en sangre.

Yamaguchi *et al* no encontraron diferencias entre los niveles de esta sustancia en sangre comparando sujetos normales con pacientes con enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, incluso haciendo diversos subgrupos dentro de los enfermos. Los autores miden la defensina por un RIA propio y no dan cifras, pero según se aprecia en la figura la mediana se sitúa en torno a 200 pg/ml, oscilando el rango ampliamente, entre 0 y 2000 (Yamaguchi *et al* 2009).

Leow *et al* publicaron sus datos de una cohorte de 112 pacientes con neumonía adquirida en la comunidad. La HBD2 se midió en plasma mediante el ELISA de Prepro Tech (mediana 216 pg/ml con un rango entre 14 y 1734) y la conclusión fue que los niveles de esta proteína no se correlacionaban con los de 25OH vitamina D ni con el riesgo de mortalidad a los 30 días (Leow *et al* 2011). Lippross *et al* midieron la evolución de los niveles de HBD2 en suero en un grupo de pacientes politraumatizados y los compararon con otros marcadores de inflamación o de inmunidad innata. Los niveles de HBD2 al ingreso eran 7 veces superiores a los normales y bajaron progresivamente, normalizándose a los 8 días, mientras que los de catelicidina eran 15 veces superiores basalmente y se mantuvieron elevados los 14 días de seguimiento. Estos datos demuestran que en caso de daño tisular la respuesta de catelicidina es más precoz y potente que la de  $\beta$ -2-defensina (Lippross *et al* 2011).

Hay muy poca información sobre la presencia de  $\beta$ -defensinas en líquido pleural, no hay datos específicamente sobre HBD-2 y no se ha valorado en pacientes con hipovitaminosis D comparado con pacientes con una dotación adecuada de vitamina D.

#### **1.2.4 DEFICIENCIA DE VITAMINA D y ENFERMEDADES PULMONARES**

La prevalencia de hipovitaminosis D es alta en todo el mundo, incluso en áreas geográficas muy soleadas como el sur de Europa o los estados sureños de EE UU como Florida. Las causas son muchas y no entraremos a analizarlas, pero lo cierto es que la deficiencia de vitamina D empieza a ser un problema de salud pública global. La importancia de la hipovitaminosis D en las enfermedades óseas se conoce desde hace muchos años, pero el papel que puede jugar en el desarrollo de otras enfermedades, como las infecciosas, cardíacas o tumorales, solo se ha reconocido en las últimas décadas (Bouillon *et al* 2013, Gunville *et al* 2013).

Normalmente se considera que el marcador fundamental del estado nutricional en vitamina D es la concentración de 25OH vitamina D en sangre, al ser un metabolito estable y función directa de la entrada de vitamina D al organismo, mientras que los niveles de calcitriol en sangre están regulados por mecanismos hormonales complejos. La guía del *Institute of Medicine USA* (IOM) publicada en 2011, después de una revisión exhaustiva de la literatura, estableció que la cifra normal mínima de 25OH vitamina D en sangre para alcanzar un funcionamiento adecuado de la fisiología del hueso es 20 ng/ml (equivalente a 50 nmol/l si lo expresamos en unidades SI), de manera que se habla de déficit o hipovitaminosis D cuando los niveles séricos son inferiores a esta cifra, y se habla de déficit o hipovitaminosis D grave cuando los niveles son inferiores a 10 ng/ml. Sin embargo existe un importante desacuerdo en la comunidad científica, ya que otro grupo de expertos consideró que esta cifra de estado nutricional adecuado en vitamina D debería ser mucho mayor, del orden de 35 ng/ml, especialmente en determinados contextos clínicos o de riesgo (Holick *et al* 2011). Como muy bien sugiere una revisión exhaustiva más

reciente se necesitan muchos más ensayos clínicos aleatorizados para resolver este problema (Bouillon *et al* 2013), pero la cifra adecuada de 25OH vitamina D sérica para un normal metabolismo óseo se sitúa en torno a 20 ng/ml. Por otro lado todos los expertos coinciden en que no hay evidencia científica suficiente para establecer los niveles adecuados para un normal funcionamiento de los efectos “no clásicos” de la vitamina D (Rosen *et al* 2013).

La relación entre la hipovitaminosis D y múltiples enfermedades pulmonares se ha ido establecido en base a estudios epidemiológicos de asociación, algunos ensayos clínicos, ciertos modelos experimentales, y estimulados por el descubrimiento del papel inmunomodulador y regulador del crecimiento celular de la vitamina D (Finklea *et al* 2011). Entre estas enfermedades se encuentran las infecciones de vías aéreas superiores o inferiores (Ginde *et al* 2009, Bergman *et al* 2012, Jolliffe *et al* 2012, Murdoch *et al* 2012, Bergman *et al* 2013, He *et al* 2013, Gunville *et al* 2013, Rees *et al* 2013), la gripe (Sundaram *et al* 2012), la tuberculosis pulmonar (Martineau 2012, Ralph *et al* 2013), diversos tipos de neumonías (Remelts *et al* 2013), el asma bronquial (Wu *et al* 2012), diversos aspectos de la EPOC (Shaheen *et al* 2011, Sundar *et al* 2011, Wood *et al* 2011, Lehouck *et al* 2012, Afzal *et al* 2013, Puhan *et al* 2013), las bronquiectasias (Chalmers *et al* 2013), el cáncer de pulmón (Afzal, Bojesen *et al* 2013, Cheng 2013), las complicaciones broncopulmonares de la fibrosis quística (Finklea *et al* 2011), los trasplantados pulmonares con bronquiolitis obliterante (Anderson *et al* 2008), el aumento de rechazo y de infecciones en trasplantados pulmonares (Lowery *et al* 2012), la hipertensión pulmonar (Demir *et al* 2013) y la fibrosis pulmonar idiopática (Finklea *et al* 2011). Sin embargo, la mayoría de los estudios son de asociación, todavía hay pocos ensayos clínicos que apoyen la posible utilidad del tratamiento con vitamina D en estas enfermedades, especialmente si no se asocian a hipovitaminosis, la posible dosis útil no está definida y además no todos los estudios encuentran resultados positivos. El tema está siendo estudiado extensamente en los últimos años y las citas que se presentan son solo las más recientes o representativas. La hipovitaminosis D en los enfermos pulmonares podría ser no el factor iniciador o potenciador de la enfermedad

sino simplemente un mero biomarcador del estado general del enfermo (por ejemplo los niveles de 25OH vitamina D expresan el grado de exposición solar al que está sometido el paciente, que lógicamente sale menos de casa cuanto peor esté físicamente y por tanto cuanto menos se mueva de casa más grave será la enfermedad). Por otro lado, la hipovitaminosis D también puede ser una consecuencia de hiperconsumo de esta vitamina inducido por la enfermedad de base (por ejemplo en la sepsis grave) o por los fármacos utilizados en el tratamiento (anticonvulsivantes, rifampicina). Se ha sugerido que la inflamación es el nexo común del descenso de la 25OH vitamina D en las enfermedades agudas y crónicas (Foong *et al* 2013, Autier *et al* 2014).

## **2. HIPÓTESIS**

La hipovitaminosis D se ha relacionado con numerosas enfermedades infecciosas pulmonares y en otras localizaciones, aunque no ha sido estudiada en los derrames pleurales.

Teniendo en cuenta que uno de los principales nexos de unión entre la vitamina D y la inmunidad son los péptidos antimicrobianos LL-37 y  $\beta$ -2-defensina y que se ha descrito la producción de estos péptidos en células similares a las células mesoteliales pleurales podemos establecer la siguiente hipótesis:

Los péptidos antimicrobianos LL-37 y  $\beta$ -2-defensina intervienen en la inmunidad pleural, al sintetizarse frente a procesos infecciosos intrapleurales, y esta síntesis está modulada por los niveles de 25 OH vitamina D, el metabolito que indica el estado nutricional de esta vitamina. La respuesta, tanto a nivel pleural como sistémico, podría ser diferente según la causa del derrame pleural y la presencia o ausencia de hipovitaminosis D, postulándose que estarían más elevadas en los derrames infecciosos que en los de otra etiología.

Estos datos podrían ser de utilidad clínica (diagnóstico diferencial, pronóstico, e incluso en manejo terapéutico potencial).

### **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo General:**

Estudiar el posible papel de la vitamina D y de los péptidos antibióticos vitamina D dependientes en la patogenia, fisiopatología y diagnóstico de las enfermedades pleurales más frecuentes.

### **3.2. Objetivos específicos:**

1.-Determinar la prevalencia de hipovitaminosis D en estos pacientes, valorando los niveles de 25 hidroxivitamina D en sangre.

2.-Determinar si existen diferencias en la prevalencia de hipovitaminosis D entre los derrames pleurales de etiología más frecuente (infeccioso, cardiaco y tumoral), en los trasudados y exudados, y dentro de los infecciosos entre los complicados y los no complicados.

3.-Comprobar si son medibles los niveles de los metabolitos relacionados con la vitamina D (25OH vitamina D, 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D y VDBP) y de los antibióticos vitamina D dependientes (LL-37 y hBD-2) en líquido pleural.

4.-Analizar si existen diferencias en los niveles de los metabolitos de vitamina D en sangre, líquido pleural y en el cociente líquido pleural/sangre en los derrames pleurales de distinta etiología, en los trasudados y exudados, y dentro de los infecciosos entre los complicados y los no complicados.

5.-Analizar si existen diferencias en los niveles de los péptidos antibióticos vitamina D dependientes en sangre, líquido pleural y en el cociente líquido pleural/sangre en los derrames pleurales de distinta etiología, en los trasudados y exudados, y dentro de los infecciosos entre los complicados y los no complicados.

6.-Analizar si existen correlaciones entre los niveles de 25OH Vitamina D, 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D, VDPB y los de LL-37 y hBD-2, tanto en sangre como en líquido pleural.

7.- Valorar la utilidad diagnóstica de los metabolitos relacionados con la vitamina D y de los antibióticos vitamina D dependientes.

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

Este proyecto ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria (anexo 1).

## **4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO**

Se trata de un estudio prospectivo con respecto a las variables principales (25OH vitamina D, 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D, VDBP, LL-37 y hB2 en sangre y líquido pleural y los cocientes de las distintas molécula en Líquido Pleural/Suero -LP/S-), con recogida retrospectiva de las variables secundarias (glucosa, pH, proteínas totales, LDH, amilasa, triglicéridos y colesterol en líquido pleural y hemograma, LDH, proteínas totales, calcio total, albúmina y PCR en sangre).

## **4.2. PACIENTES**

### 4.2.1. Ámbito del estudio.

Todos los pacientes procedían de zonas urbanas y rurales del área sanitaria de Santander-Laredo (área de referencia del HUMV) y todos eran caucásicos.

### 4.2.2. Criterios de inclusión y exclusión.

Se incluyeron las muestras de líquido pleural que llegaban al laboratorio de Bioquímica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV), de las que en un intervalo máximo de 48 horas debería existir volumen suficiente de suero de los mismos pacientes en el laboratorio; si no existía se desechaba el caso. Se excluyeron también aquellos pacientes que recibían fármacos (glucocorticoides, inmunosupresores, quimioterapia antineoplásica, suplementos de vitamina D, etc) o padecían enfermedades (sarcoidosis, trasplantados, enfermedades inmunológicas, malnutrición grave, etc.) que pudiesen alterar los resultados.

#### 4.2.3. Pacientes y muestras

En el estudio final se analizaron los datos de los líquidos pleurales y sus muestras correspondientes de sangre de 163 pacientes ingresados, aunque en algunos casos no se dispuso de muestra suficiente para hacer todas las determinaciones. Inicialmente se habían obtenido muestras de 204 pacientes, que se recogieron entre Septiembre de 2010 y Agosto de 2012, de las que se descartaron las que no cumplían criterios de inclusión, por tratarse de líquidos pleurales repetidos del mismo paciente recogidos por error (n=16), líquidos biológicos no pleurales (n=6), muestras mal identificadas (n=4) o pacientes en tratamiento con fármacos modificadores del metabolismo fosfocálcico, inmunosupresores, o patología modificadora de los niveles de vitamina D (n=15). Las muestras de suero y líquido pleural sobrante tras la realización de las determinaciones rutinarias, fueron congeladas a -80° hasta la realización de las determinaciones específicas del estudio. Todas las muestras se habían obtenido exclusivamente con fines diagnósticos o terapéuticos, según el criterio de los médicos asistenciales. No se ha obtenido ninguna muestra con fines exclusivamente investigacionales. Todos los pacientes habían dado su consentimiento informado para obtener las muestras de sangre y de líquido pleural. Durante el estudio, se han mantenido todos los criterios de confidencialidad en el manejo de las muestras y de los datos clínicos de las historias. Los datos demográficos, el diagnóstico etiológico final y los datos clínicos relevantes se obtuvieron de la historia clínica del paciente y se presentan en los resultados. Esta colección de muestras ha sido inscrita en el Registro Nacional de Biobancos, sección colecciones del Instituto Carlos III (anexo 2).

Por protocolo en este hospital en todos los líquidos pleurales se estudia la presencia, identificación y el recuento de las células, la existencia de células malignas, la existencia de cultivo positivo y los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol, proteínas, LDH, amilasa, y ADA. De las muestras de suero se recogieron los datos obtenidos por peticiones rutinarias (Hemograma completo

con fórmula leucocitaria, proteínas totales, VSG, PCR, LDH, Calcio total y albúmina).

#### 4.2.4. Clasificación de los líquidos pleurales

Los líquidos pleurales se clasificaron de la siguiente forma:

1) Infeccioso (n=51): cuando los pacientes presentaron una condensación acompañando el derrame, cuando presentaron un cultivo positivo en esputo o líquido pleural para algún microorganismo, o cuando la anatomía patológica fue sugestiva de infección. En este grupo se incluyeron también los derrames de etiología tuberculosa que cumplían criterios clínicos y radiológicos compatibles con tuberculosis asociados a ADA alto, y Mantoux positivo. Los derrames de tipo infeccioso fueron clasificados en: A) Complicado: cuando, para su resolución fue necesaria la colocación de un tubo de tórax (n=17) y B) No complicado: cuando no fue necesaria la colocación de un tubo de tórax para su resolución (n=37) (Bhatnagar *et al* 2013, Sahn 2007).

2) Maligno (n=38): cuando el derrame presentó citología o biopsia positiva para células malignas.

3) Cardíaco (n=44): cuando el derrame se trató de un trasudado según los criterios de Light (Light *et al* 1972) y el paciente presentó datos clínicos de insuficiencia cardíaca. Se incluyeron aquí los casos de insuficiencia cardíaca franca y también aquellos en los que el líquido pleural cumplía criterios de exudado, en pacientes cardiopatas que habían recibido diuréticos previamente.

4) Miscelánea (n=30): Se incluyen aquí los DP debidos a TEP (cuando había criterios radiológicos de TEP en un Angio-TAC), los postquirúrgicos (cuando el derrame aparecía tras la realización de una intervención quirúrgica, sin que hubiese otra causa aparente) y todas las causas poco frecuentes, no englobables en los tres grupos anteriores (pancreatitis, perforación esofágica,

de causa no filiada, etc). Este grupo no ha sido analizado en el estudio etiológico de forma individual, debido a su heterogeneidad y al pequeño número presente de cada causa.

A efectos prácticos, se consideraron exudado los DP de los grupos infeccioso, maligno, postoperatorios, los asociados a pancreatitis o TEP y un caso por perforación esofágica (n=107), y trasudado los derrames de etiología cardiaca o asociados a glomerulonefritis (n=45). Los 11 LP restantes son líquidos no pertenecientes a los grupos previamente citados.

La información relevante de estos pacientes así como los resultados del estudio se registraron en un cuaderno de recogida de datos (CRD) (anexo 3).

#### 4.2.5. Procedimiento de confidencialidad

Con el objetivo de garantizar la confidencialidad de la identidad e información procedente de los pacientes incluidos en el estudio, de acuerdo con el Real Decreto 1720/2007 de 21 de diciembre por el que se aprueba el desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de datos de carácter personal, se utilizó un sistema de codificación. Cada muestra fue identificada en el CRD mediante un número según el orden de incorporación al estudio.

### **4.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS EN SUERO Y LÍQUIDO PLEURAL**

Para minimizar las variaciones interensayo las muestras de sangre y líquido pleural de cada paciente se realizaron siempre en el mismo lote y la distribución de pacientes se hizo por orden de aparición, para acortar los tiempos de congelación.

#### **4.3.1. 25OH VITAMINA D o CALCIFEDIOL**

Los niveles de 25OH vitamina D en suero se midieron mediante el ensayo competitivo IDS-iSYS de Immunodiagnostic Systems Ltd, Boldon, Tyne & Wear, Gran Bretaña, utilizando su Analizador de quimioluminiscencia automatizado, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de suero son sometidas a una fase de pretratamiento para desnaturalizar la DBP. Estas muestras tratadas se neutralizan después con un tampón y se añade un anticuerpo policlonal de oveja anti-25OH Vitamina D marcado con un derivado del éster de acridinio. Tras una fase de incubación se añaden partículas magnéticas enlazadas a 25 OH Vitamina D. Después de una nueva fase de incubación las partículas magnéticas se capturan utilizando un imán. Tras una fase de lavado y la adición de reactivos desencadenantes la luz emitida por el acridinio está inversamente relacionada con la concentración de 25 OH Vitamina D de la muestra original. Se utilizan dos calibradores de 25 OH Vitamina D, específicos para cada ensayo, para realizar el ajuste de la curva maestra. La concentración de 25 OH Vitamina D se calcula automáticamente utilizando un ajuste de curva logístico de 4 parámetros. El rango medible es 5-140 ng/ml. Según el fabricante el intervalo de referencia del 95% para adultos normales, obtenido a partir de 272 adultos aparentemente sanos calculado mediante la directriz C28-A2 del NCCLS fue 5,9-64,9 ng/ml. El CV (coeficiente de variación) del ensayo en el rango medio (25 ng/ml) fue del 5,5% (intraensayo) y del 10,4% (interensayo). Comparado con un método de ID-LC-MS/MS (cromatografía líquida con dilución de isótopo, en tándem con espectrometría de masas) el coeficiente de correlación (r) entre ambos fue de 0,97. La reactividad cruzada del ensayo fue del 100% para la 25OHD<sub>2</sub>, 25OHD<sub>3</sub> y 24,25(OH)<sub>2</sub>D, mientras que es inferior al 3% para la D<sub>2</sub> o la D<sub>3</sub> a concentraciones superiores a las habituales. No se detectaron sustancias que interfirieran en la determinación. El laboratorio de Endocrinología de Servicio de Bioquímica Clínica del HUMV que realiza la determinación participa en el Control de Calidad externo DEQAS y posee el sello de calidad de dicha entidad (comparativa de 1300 participantes de 52 países y 20 métodos diferentes en 2013).

#### **4.3.2. 1,25(OH)<sub>2</sub> VITAMINA D o CALCITRIOL**

Los niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D en suero se midieron mediante el radioinmunoensayo de DiaSorin Inc, Stillwater MN USA, utilizando el procedimiento recomendado por el fabricante. El ensayo tiene dos pasos. Incluye una extracción preliminar y la subsiguiente purificación de los metabolitos de la vitamina D del suero mediante cartuchos C18OH. Tras la extracción la muestra se somete a un ensayo competitivo tipo RIA. El RIA se basa en un anticuerpo policlonal de conejo específico tanto para 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>2</sub> como 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> y como trazador se usa 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> marcado con I125. La muestra, el anticuerpo y el trazador se incuban durante 2 hs a temperatura ambiente y la separación final se realiza mediante un segundo complejo de precipitación de anticuerpos (anticuerpos de cabra anti anticuerpos de conejo). Tras la centrifugación y decantación, la parte unida remanente en el tubo de ensayo se cuenta en un contador gamma. Los valores se calculan de forma directa a partir de una curva de calibración (%B/B<sub>0</sub> frente a un método de concentración logarítmica basado en un programa de ajuste de línea estriada alisada). Según el fabricante el intervalo de referencia del 95% estimado con un método no paramétrico siguiendo la directriz C28-A2 fue de 25,1-66,1 pg/ml en 123 donantes sanos de ambos sexos y de edades entre 21 y 68 años. La recuperación del analito tras la extracción fue del 99%. El CV del ensayo en el rango medio (41,3 pg/ml) fue de 7,7% (intraensayo) y 11,1% (interensayo). La sensibilidad del ensayo fue 2 pg/ml. La reactividad cruzada con 24,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>, 25,26(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> y 25OH D<sub>3</sub> para cifras muy superiores a las normales de estos analitos fue en todos los casos inferior al 0,5%. No se detectaron sustancias que interfirieran en la determinación.

#### **4.3.3. VDBP**

La cuantificación de VDBP se realizó mediante ELISA con el kit Quantikine Human Vitamin D Binding Protein (R&D Systems Europe, Abingdon,

UK). El inmunoensayo emplea la técnica tipo sándwich. Se utiliza una microplaca recubierta con un Anticuerpo (Ac) monoclonal anti-VDBP. Tanto los estándares como las muestras son pipeteados en la microplaca y la VDBP presente en las muestras se liga al Ac y es inmovilizada. Después de los lavados para eliminar las sustancias no ligadas, un Ac monoclonal específico anti-VDBP ligado a enzima es añadido a todos los pocillos de la microplaca. A continuación y tras un segundo lavado que elimina el Ac ligado a enzima que no se ha unido a VDBP o en exceso, se añade una solución substrato que reacciona con el enzima desarrollando color proporcionalmente a la cantidad de VDPB ligado en el paso inicial. Una solución de parada frena el proceso de desarrollo de color de igual manera en todos los pocillos y la intensidad de color es analizada mediante espectrofotometría (450 nm). Los valores se calculan de forma directa a partir de una curva de calibración de 4-PL (logística de 4 parámetros). La sensibilidad del ensayo es de 0,65 ng/ml y la variabilidad intra e interensayo de <5% y <10% respectivamente. No existe reacción cruzada en el ensayo con otras proteínas como alfa-feto-proteína o albúmina, o con los metabolitos de la vitamina D. La VDBP en condiciones normales está en exceso en el organismo. Los valores de normalidad en suero son 55-473 µg/ml (equivalentes a mg/l). Rango de medida de 0 a 1000 ng/ml (las muestras son diluidas previamente 1/2000).

#### **4.3.4. CATELICIDINA o LL-37**

Se determinó mediante el HK321 Human LL-37 ELISA Kit de Hycult Biotech® (Uden, The Netherlands). Se trata de un ELISA tipo sándwich. Una vez realizado el inmunoensayo con las sucesivas incubaciones con los anticuerpos específicos y tras reacción del sustrato con el enzima conjugado, se lee la densidad óptica de cada pocillo en un espectrofotómetro a 450 nm. El cálculo de resultados se realiza de manera adecuada en una curva AutoSpline. El rango de medida está entre 0,1-100 ng/ml. Tiene una sensibilidad de 0,14 ng/ml y una variabilidad inter e intraensayo < 10 y < 15% respectivamente.

#### **4.3.5. $\beta$ -2-DEFENSINA**

Este péptido se cuantificó mediante el ELISA Kit Human Beta Defensin 2 de Alpha Diagnostic International® (San Antonio, TX). Se basa en la unión de la  $\beta$ -2-defensina con dos anticuerpos en un ensayo inmunoenzimático tipo sándwich, uno de ellos inmovilizado en la placa y otro conjugado a biotina que posteriormente se une a un conjugado-HRP (estreptavidina). El desarrollo de color en el inmunoensayo al añadir el sustrato (TMB) es directamente proporcional a la cantidad de  $\beta$ -2-defensina presente en la muestra. Los valores se calculan de forma directa (densidad óptica de los estándares frente a concentración) a partir de una curva *point-to-point*. No existen muchos estudios acerca de valores de referencia y la información técnica del ensayo dice que los valores séricos podrían ir de 0-770 pg/ml. Se ha evaluado especificidad frente a Human BD-1, hBD3 o hNP-1 sin existir reactividad cruzada significativa. Sensibilidad 5 pg/ml. Variabilidad inter e intraensayo es <10 y <15% respectivamente. El rango de medida de  $\beta$ -2-defensina oscila de 12,5-200 pg/ml.

#### **4.4. PRUEBAS ANALÍTICAS GENERALES EN SANGRE Y LÍQUIDO PLEURAL**

El hemograma en sangre se valoró mediante un analizador Coulter S+ Counter (Coulter, Hialeah, FL USA). Las determinaciones rutinarias se realizaron mediante análisis automatizado en un ADVIA 2400 Chemistry System (Siemens®) usando reactivos suministrados por Siemens® y según las reacciones enzimáticas específicas (Glucosa: método glucosa oxidasa, Calcio Total: método del Arsenazo III, Fósforo: método del complejo del molibdato amónico, Albúmina: método del verde de Bromocresol, Colesterol: reacciones de la esterasa y oxidasa de colesterol, Triglicéridos: método de Fossati, Fosfatasa Alcalina Total: valoración de la actividad de la enzima sobre el sustrato 4-nitrofenil-fosfato 4NPP, LDH: conversión de L-lactato a piruvato en presencia de NAD o nicotinamida adenín-dinucleótido). Los niveles de calcio total fueron corregidos por la albúmina. La ADA se midió mediante

espectrofotometría automatizada en el ADVIA 1200 de Siemens (reacción acoplada de la glutamato deshidrogenasa a partir de la velocidad de desaparición del NADH medido a 340 nm), utilizando reactivos de BioSystems (Biosystems SA, Barcelona, España).

La Proteína C reactiva se determinó mediante Inmunoturbidimetría potenciada con Látex en un Advia 2400 de Siemens; valores normales <0,5 mg/dl.

La determinación del pH en LP se realizó tomando la muestra con jeringa heparinizada, que se taponó inmediatamente hasta su determinación. El pH se se midió con un Analizador de gases mediante electrodo selectivo ABL800 Flex de Radiometer (Radiometer Ibérica, Madrid, España).

#### **4.5. ANÁLISIS CITOLÓGICO Y MICROBIOLÓGICO DEL LÍQUIDO PLEURAL**

Según los métodos rutinarios utilizados por los Servicios de Anatomía Patológica y Microbiología.

#### **4.6. RASTREO BIBLIOGRÁFICO**

Se realizó mediante la búsqueda informática de las palabras clave *pleural effusion, pleura, lung, LL-37, Cathelicidin, Defensin,  $\beta$ -2-defensin, Vitamin D, calcifediol, calcitriol y Vitamin D Binding Protein*, aisladas o agrupadas, en las bases de datos *PubMed, Scopus, ScienceDirect, Springer, Ovid, Highwire Press, Web of Science y Google academic*.

#### **4.7. PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se ha generado una base de datos empleando el paquete estadístico SPSS versión 15.0.

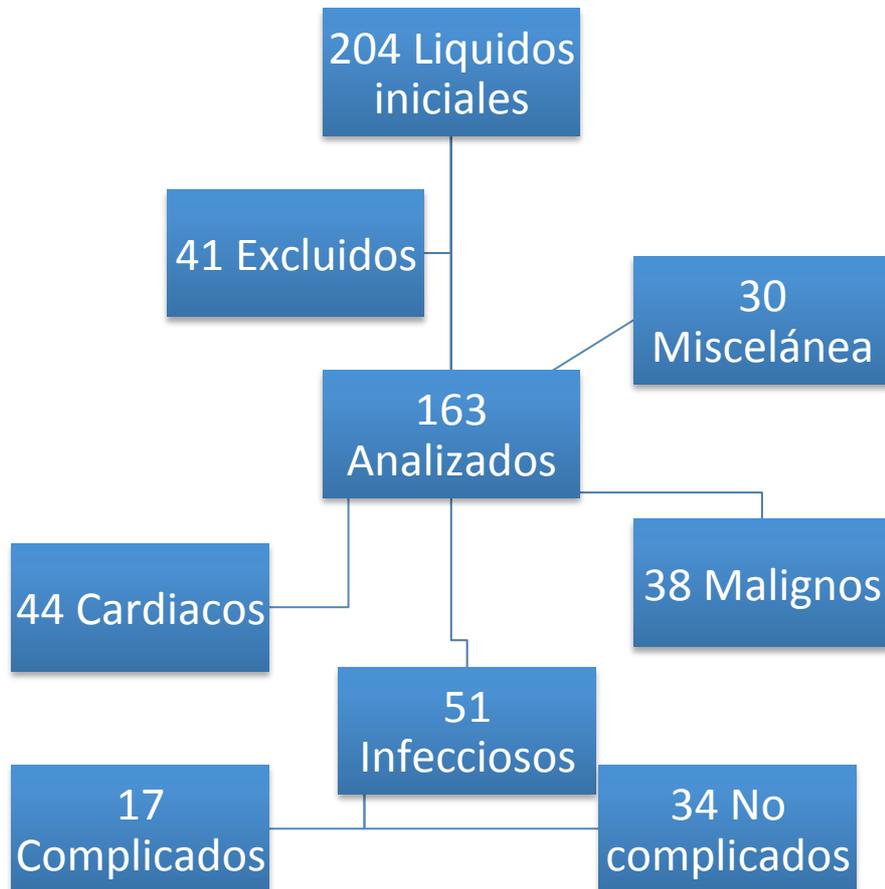
El cálculo del tamaño muestra se realizó a través de la aproximación de ARCOSENO, teniendo en cuenta la prevalencia de hipovitaminosis D en la población general y en el grupo de pacientes con derrame pleural, y la diferencia de sus niveles en los distintos grupos etiológicos. El número de pacientes empleado es similar al utilizado en otros estudios relevantes sobre la materia. En las variables cuantitativas se ha comprobado el ajuste de los datos a la distribución normal por medio del test de Kolmogorov-Smirnov y en las tablas se presenta, según la distribución de las variables, la media aritmética y la desviación estándar (DE) la mediana y el rango. Para comparación global de múltiples grupos se empleó el ANOVA o el test Kruskal-Wallis, según estuviese indicado. Para comprobar las diferencias entre datos no emparejados se emplearon los tests de Student o de Mann-Whitney y para datos emparejados los de Student paired o Wilcoxon, según estuviese indicado. Para comprobar la relación entre variables numéricas se utilizaron los coeficientes de correlación de Pearson o de Spearman según dichas variables se ajustasen o no a la distribución normal. En la evaluación de la concordancia entre test diagnósticos empleamos el índice Kappa, calculando además el área bajo la curva (AUC) de la características operativas del receptor (ROC), tomando como test de referencia los resultados del diagnóstico por componentes moleculares, y considerando positivos los resultados  $\geq 0,35$  KU/L. En la comparación del AUC de dos curvas ROC empleamos el procedimiento de DeLong (DeLong *et al* 1988) y para la estimación y representación gráfica de las curvas ROC se empleó el software MEDCALC versión 11.6.1.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). El resto del análisis estadístico se realizó con el programa SPSS v.15.

## **5. RESULTADOS**

## **5.1 POBLACIÓN INCLUIDA EN EL ESTUDIO**

En el estudio final se analizaron los datos de los líquidos pleurales y sus muestras correspondientes de sangre de 163 pacientes ingresados, aunque en algunos casos no se dispuso de muestra suficiente para hacer todas las determinaciones. Inicialmente se habían obtenido muestras de 204 pacientes, que se recogieron entre Septiembre de 2010 y Agosto de 2012, de las que se descartaron las que no cumplían criterios de inclusión, por tratarse de líquidos pleurales repetidos del mismo paciente recogidos por error (n=16), líquidos biológicos no pleurales (n=6), muestras mal identificadas (n=4) o pacientes en tratamiento con fármacos modificadores del metabolismo fosfocálcico, inmunosupresores, o patología modificadora de los niveles de vitamina D (n=15) . De los 163 líquidos pleurales, 30 pertenecían al grupo de miscelánea (causas de derrame pleural raras tal y como se explica en el apartado 4.2.4 de material y métodos). 44 eran de etiología cardiaca, 38 malignos y 51 infecciosos (17 complicados y 34 no complicados). De los 163, atendiendo a criterios etiológicos se catalogaron 45 como trasudados y 107 como exudados. La distribución de los líquidos pleurales se explica en el diagrama de la Figura 5.1.

Figura 5.1. Distribución de los líquidos pleurales



## **5.2 ESTADO NUTRICIONAL EN VITAMINA D EN LOS PACIENTES CON DERRAME PLEURAL**

### **5.2.1 PREVALENCIA DE HIPOVITAMINOSIS D EN PACIENTES CON DERRAME PLEURAL**

Se midieron los niveles séricos de 25OH vitamina D en un total de 163 pacientes con derrame pleural (65 mujeres y 98 varones con una edad media de  $69 \pm 17,2$  años). Las cifras obtenidas fueron  $15,3 \pm 9,7$  ng/ml (media  $\pm$  desviación estándar). De los 163 pacientes estudiados 113 (69,3%) presentaban déficit de vitamina D (niveles de 25OH vitamina D  $< 20$  ng/ml) y de ellos 41 (28,1%) presentaban déficit severo (niveles  $< 10$  ng/ml).

En resumen:

*La prevalencia de hipovitaminosis D en estos pacientes es muy alta*

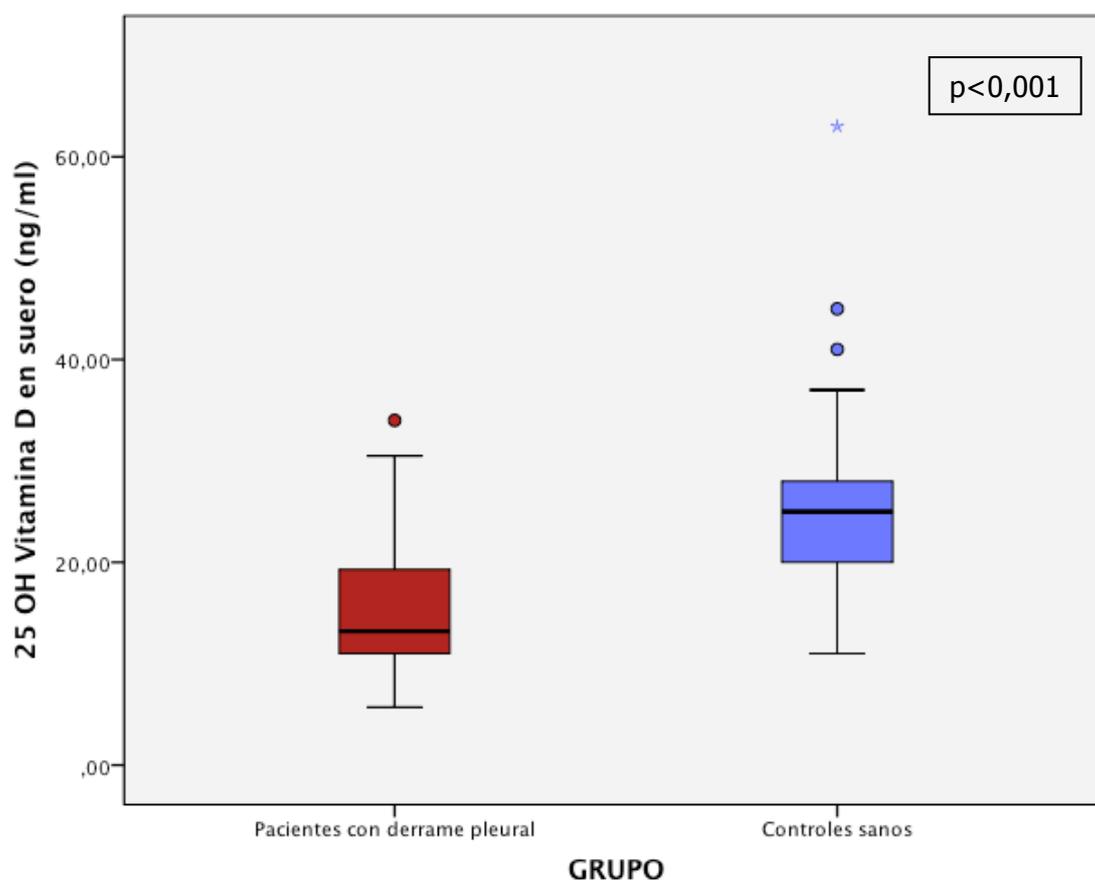
### **5.2.2 PREVALENCIA DE HIPOVITAMINOSIS D EN PACIENTES CON DERRAME PLEURAL COMPARADOS CON LA DE SUJETOS SANOS EMPAREJADOS POR EDAD, ZONA GEOGRÁFICA Y ÉPOCA DEL AÑO**

Se compararon 37 pacientes con derrame pleural (21 infecciosos, 7 malignos y 9 cardiacos) con una edad de  $55,7 \pm 16$  años, con un número igual de sujetos sanos emparejados por edad ( $55 \pm 16$  años) y época del año, para evitar efectos estacionales. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de 25OH Vitamina D, que eran claramente inferiores en el grupo con derrame pleural comparado con el grupo control (13,2 ng/ml (min-max 5,7-34) vs 25,8 ng/ml (min-max 11-63) (test U de Mann-Whitney  $p < 0,001$ ). Sin embargo los niveles séricos de VDBP no eran diferentes (280,8 mg/l (min-max 27,7-494,8) vs 218,9 mg/l (min-max 53,5-415,2) (test U de Mann-Whitney,  $p = 0,34$ ).

En resumen:

*El grado de hipovitaminosis D en estos pacientes es muy superior al de los sujetos sanos, sin que se detecten diferencias en la VDBP.*

Figura 5.2. Niveles de 25OH vitamina D en suero en pacientes con derrame pleural y en controles sanos emparejados por edad y época del año.



### 5.2.3 HIPOVITAMINOSIS D SEGÚN LA CAUSA DEL DERRAME PLEURAL:

Los datos de los pacientes de los tres subgrupos etiológicos de derrame pleural estudiados, se muestran en las tablas siguientes (5.1 a 5.4):

Tabla 5.1. Hipovitaminosis D en los DP. Diferencias entre los tres grupos etiológicos (los porcentajes de la primera línea de la tabla hacen referencia al total de líquidos pleurales incluidos inicialmente, 163, de los que se excluyeron 30 debidos a otras causas).

	CARDIACO	TUMORAL	INFECCIOSO	p
Número de Pacientes n(%)	44(26,9%)	38(23,3%)	51(31,3%)	
Edad (media+/-desviación estándar) (años)	<b>75+/-14</b>	<b>71+/-13</b>	<b>61+/-20,67</b>	<b>p=0,002</b>
Varones n(%)	18(40,9%)	22(57,9%)	32(62,7%)	p=0,88
25OH vitamina D (ng/ml) (media+/-desviación estándar)	<b>12,8+/-7,4</b>	<b>18,9+/-8,11</b>	<b>15,71+/-13,06</b>	<b>p=0,001</b>
Déficit n(%)	<b>34(77,2%)</b>	<b>20(52%)</b>	<b>33(64,7%)</b>	<b>p=0,019</b>
Déficit severo n(%)	<b>18(40,9%)</b>	<b>3(7,9%)</b>	<b>15(29,4%)</b>	<b>p=0,002</b>

En el estudio comparativo global (test de Kruskal-Wallis) se observa que existen diferencias en la edad, en los niveles de 25OH vitamina D y en el grado de hipovitaminosis entre ellos. Con el fin de identificar los grupos distintos se hizo una comparación grupo a grupo mediante el test U de Mann-Whitney. Los resultados se presentan en las tablas siguientes (5.2 a 5.4).

Tabla 5.2. Diferencias entre DP cardiacos y tumorales.

	CARDIACO	TUMORAL	p
Número de Pacientes n(%)	44(26,9%)	38(23,3%)	
Edad (media+/-desviación estándar) (años)	75+/-14	71+/-13	p=0,08
Varones n(%)	18(40,9%)	22(57,9%)	p=0,913
25OH vitamina D (ng/ml) (media+/-desviación estándar)	<b>12,8+/-7,4</b>	<b>18,9+/-8,11</b>	<b>p=0,000</b>
Déficit n(%)	<b>34(77,2%)</b>	<b>20(52%)</b>	<b>p=0,019</b>
Déficit severo n(%)	<b>18(40,9%)</b>	<b>3(7,9%)</b>	<b>p=0,002</b>

Los pacientes con derrame de causa cardiaca no se diferencian de los tumorales en la edad ni el sexo, pero presentan niveles más bajos de 25OH vitamina D (test U de Mann-Whitney) y tienen una proporción mucho más alta de hipovitaminosis D, especialmente de la más grave (test Chi-cuadrado de Pearson).

Tabla 5.3. Diferencias entre DP cardiacos e infecciosos.

	<b>CARDIACO</b>	<b>INFECCIOSO</b>	<b>p</b>
Número de Pacientes n(%)	44(26,9%)	51(31,3%)	
Edad (media+/-desviación estándar) (años)	<b>75+/-14</b>	<b>61+/-20,67</b>	<b>p=0,001</b>
Varones n(%)	18(40,9%)	32(62,7%)	p=0,88
25OH vitamina D (ng/ml) (media+/-desviación estándar)	12,8+/-7,4	15,71+/-13,06	p=0,294
Déficit n(%)	34(77,2%)	33(64,7%)	p=0,222
Déficit severo n(%)	18(40,9%)	15(29,4%)	p=0,299

Al comparar los derrames cardiacos con los infecciosos se evidencia una menor edad en los infecciosos (test t de Student), pero no hay diferencias en el sexo ni en los niveles de 25OH vitamina D ni en el grado de hipovitaminosis D.

Tabla 5.4. Diferencias entre DP tumorales e infecciosos.

	TUMORAL	INFECCIOSO	p
Número de Pacientes n(%)	38(23,3%)	51(31,3%)	
Edad (media+/-desviación estándar) (años)	<b>71+/-13</b>	<b>61+/-20,67</b>	<b>p=0,030</b>
Varones n(%)	22(57,9%)	32(62,7%)	p=0,643
25OH vitamina D (ng/ml) (media+/-desviación estándar)	<b>18,9+/-8,11</b>	<b>15,71+/-13,06</b>	<b>p=0,010</b>
Déficit n(%)	20(52%)	33(64,7%)	p=0,090
Déficit severo n(%)	<b>3(7,9%)</b>	<b>15(29,4%)</b>	<b>p=0,007</b>

Al comparar los derrames tumorales con los infecciosos se evidencia una menor edad, unos niveles más bajos de 25OH vitamina D y una mayor proporción de hipovitaminosis grave en los infecciosos, pero no hay diferencias en el sexo (test de Chi-cuadrado).

En resumen:

*La hipovitaminosis es más frecuente y grave en los DPC (Derrames pleurales de origen cardiaco) y menos frecuente en los DPT (Derrames pleurales tumorales), quedando los DPI (Derrames pleurales infecciosos) en un nivel intermedio.*

*Los pacientes con DPC tienen más edad que los de los grupos DPI o DPT.*

#### **5.2.4 INFLUENCIA DE LA EDAD SOBRE LOS NIVELES DE 25OH VITAMINA D EN LOS DERRAMES PLEURALES**

Tal y como se ha evidenciado en el capítulo anterior existen diferencias en la edad entre los distintos tipos etiológicos de derrame pleural, especialmente si comparamos los cardiacos con los infecciosos. Para analizar la posible influencia de la edad en los hallazgos se hizo un estudio de correlación

entre los niveles de 25 OH vitamina D y la edad en todo el grupo, encontrándose una muy débil correlación negativa, no significativa estadísticamente (Rho de Spearman  $r_s = -0,159$  y  $p = 0,088$ ) (Figura 5.3). Incluso si se elimina el valor extremo, claro *outlier* de la muestra, la correlación sigue siendo muy débil, sin alcanzar significación estadística por muy poco ( $r_s = -0,181$  y  $p = 0,053$ ) (figura 5.4).

Figura 5.3. Correlación entre los niveles de 25OH Vitamina D en suero y la edad.

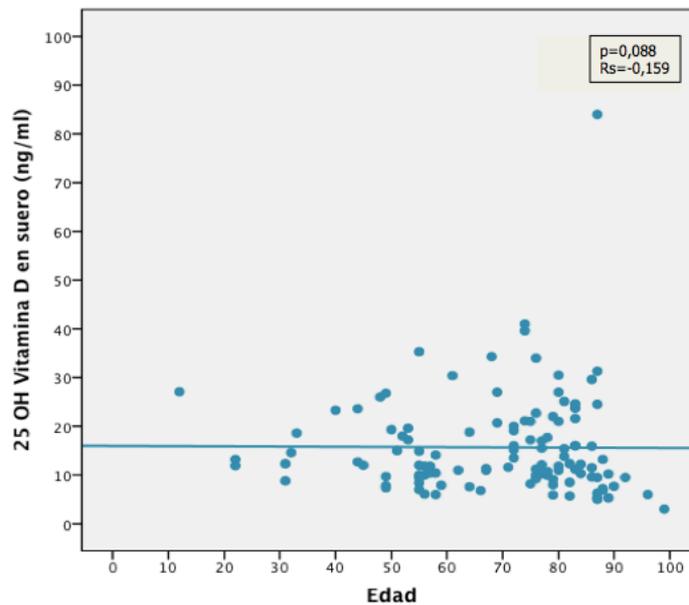
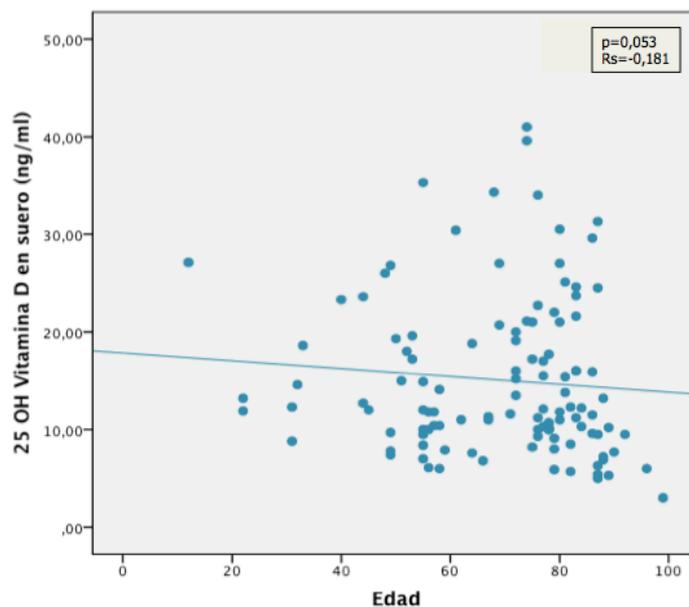


Figura 5.4. Correlación entre los niveles de 25OH Vitamina D en suero y la edad tras eliminar el valor extremo.



Al dividir los distintos grupos etiológicos en terciles por edad (<63, 63-79, >79 años), no se objetivan diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos de edad para 25OH vitamina D en ninguno de los grupos etiológicos (Infeccioso Kruskal-Wallis  $p=0,279$ , Tumoral Kruskal-Wallis  $p=0,764$  y Cardíaco Kruskal-Wallis  $p=0,637$ ), aunque al hacer esta comparación la n se queda pequeña en algún subgrupo. Otras técnicas estadísticas confirmaron este hecho.

Tabla 5.5 Niveles de 25OH Vitamina D en suero en los tres terciles de edad de cada grupo etiológico. Los resultados se expresan en mediana (mínimo, máximo) ng/ml.

Grupo etiológico	n	<63 años	n	63-79 años	n	> 79 años	p
<b>Infeccioso</b>	25	12,7(6, 30)	8	12,5 (9, 34)	9	8,6 (5, 84)	0,279
<b>Tumoral</b>	7	14,9(9, 35)	18	18,4 (9, 41)	9	21,6 (7, 30)	0,764
<b>Cardíaco</b>	7	10,4(7,19,6)	12	10 (5,9, 39)	20	11,5 (3, 30)	0,637

Al analizar las diferencias en los niveles de 25OH vitamina D entre los diferentes grupos etiológicos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el grupo de edad de menos de 63 años (Kruskal-Wallis,  $p=0,365$ ) (figura 5.5), aunque sí se encontraron diferencias significativas en el grupo 63-79 años (Kruskal-Wallis,  $p=0,01$ ) (Figura 5.6) y en el de >79 años (Kruskal-Wallis,  $p=0,049$ ) (figura 5.6). En el grupo de pacientes de 63 a 79 años se objetivaron niveles más altos de 25OH D en los derrames tumorales que en los cardíacos (U de Mann-Whitney,  $p=0,003$ ) (figura 5.6). En pacientes mayores de 79 años se objetivaron niveles más altos en los derrames tumorales que en los infecciosos (U de Mann-Whitney,  $p=0,024$ ) (figura 5.7).

Figura 5.5. Niveles de 25OH Vitamina D en suero en los tres grupos etiológicos para edad menor de 63 años.

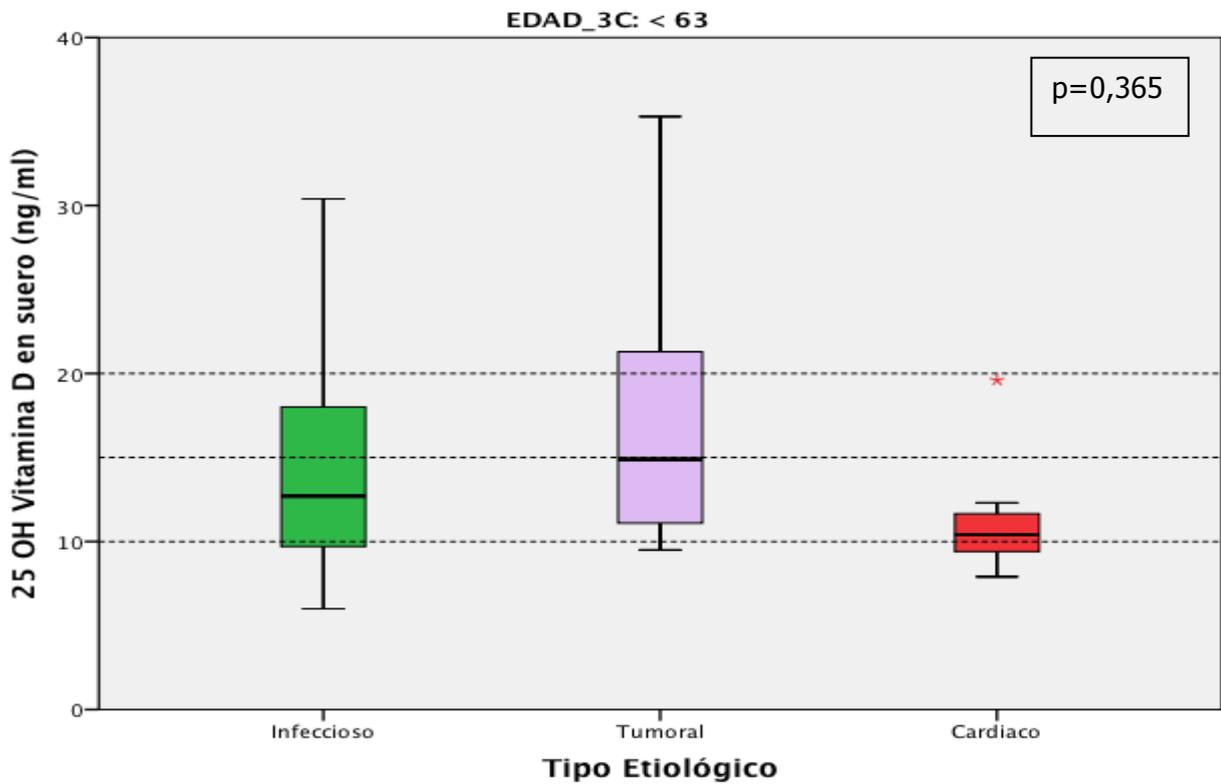


Figura 5.6. Niveles de 25OH Vitamina D en suero en los tres grupos etiológicos para una edad entre 63 y 79 años.

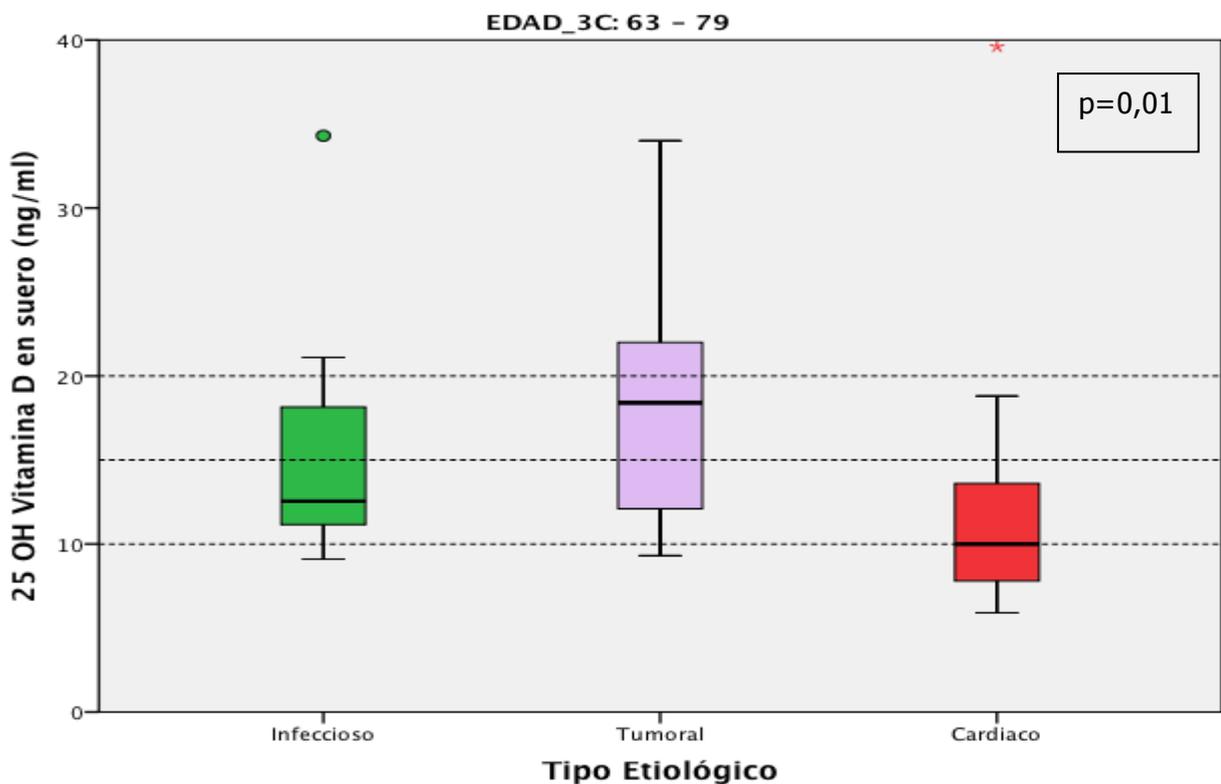
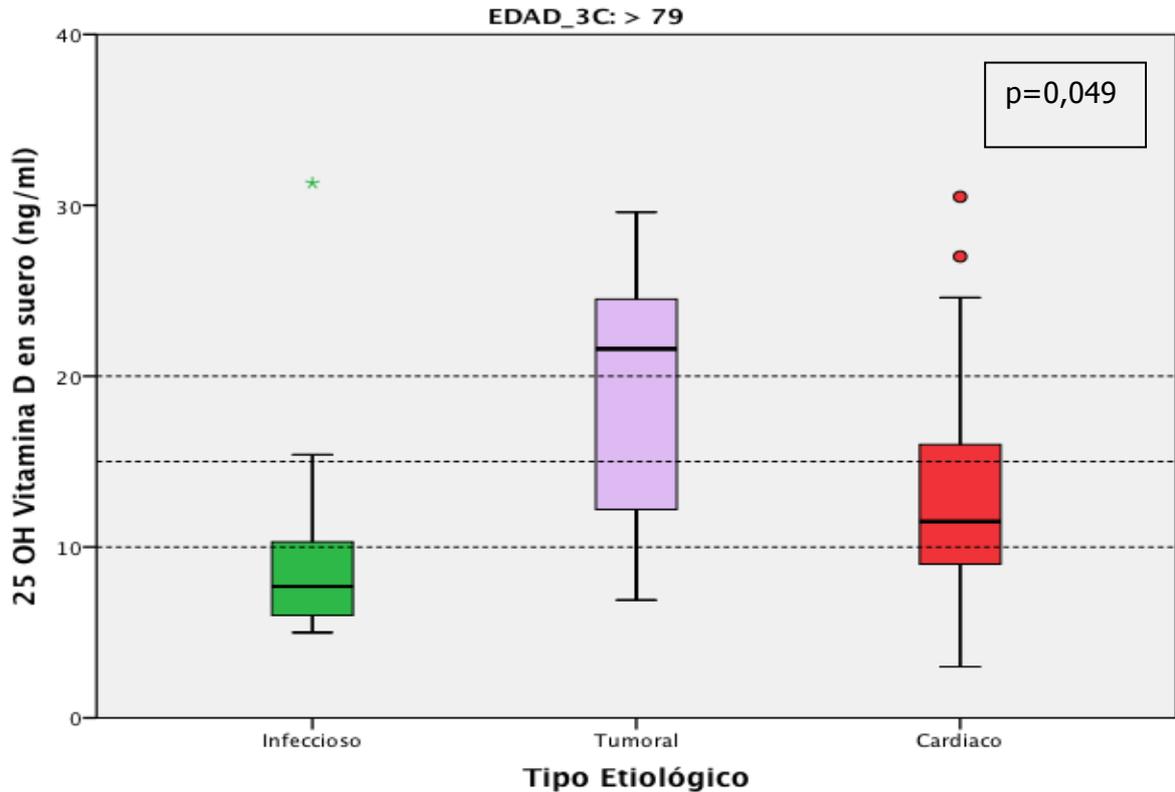


Figura 5.7. Niveles de 25OH Vitamina D en suero en los tres grupos etiológicos para una edad mayor de 79 años.



En resumen:

*La edad no parece jugar un papel relevante en los niveles séricos de 25OH vitamina D en estos pacientes. Por grupos de edad se confirman los datos del total de la muestra, especialmente en los grupos de edad más avanzada*

### 5.2.5 INFLUENCIA DE LA ESTACIONALIDAD SOBRE LOS NIVELES DE 25 OH VITAMINA D EN LOS DERRAMES PLEURALES

Las muestras se obtuvieron de forma consecutiva a lo largo de dos años, de manera que los niveles de 25OH vitamina D en sangre podrían verse influenciados por la irradiación solar a la que habían estado expuestos los pacientes durante las semanas anteriores, especialmente si comparamos el primer trimestre del año (Enero-Marzo, mínima irradiación) con el tercero

(Julio- Septiembre, máxima irradiación). Para analizar estas posibles diferencias primero se hizo la prueba de Kruskal-Wallis, comparando globalmente los 4 trimestres en el grupo total de derrames. Esta prueba demostró diferencias entre ellos ( $p=0,028$ ). En las comparaciones trimestre a trimestre comprobamos que se observan niveles más bajos en el primer trimestre 12 (5, 84) ng/ml ( $n= 45$ ) comparados con los del tercer trimestre 20,3 (6, 41) ng/ml ( $n= 43$ ) con una  $p$  de 0,016. Sin embargo ni el invierno ni el verano se diferencian de la primavera o el otoño. Este mismo patrón también se observa en los exudados 12,1 (5, 84) ng/ml ( $n= 30$ ) y 22,8 (15, 41) ng/ml ( $p= 0,01$ ). Por otra parte, si se analiza por subgrupos etiológicos o en el subgrupo de los trasudados no hay diferencias significativas, probablemente debido a una insuficiente  $n$  de cada subgrupo por trimestre.

La influencia de la estacionalidad probablemente tiene poco peso en nuestros resultados, ya que, al analizar por trimestres mediante el chi-cuadrado para variables cualitativas, no se encuentran diferencias estadísticamente significativa en la distribución de pacientes por trimestres, ni por grupos etiológicos ( $p=0,102$ ), ni en la división en complicados y no complicados ( $p=0,237$ ), ni en la división en trasudados y exudados ( $p=0,107$ ). Es decir, ninguno de los grupos se acumula de forma estadísticamente significativa en ninguno de los trimestres del año.

### **5.2.6 HIPOVITAMINOSIS D SEGÚN EL DERRAME SEA EXUDADO O TRASUDADO**

Las características de los exudados y trasudados de pacientes con derrame pleural, y el estudio de las diferencias entre los grupos, se muestran en la tabla 5.6.

Se observan diferencias significativas en la edad (son más jóvenes los que tienen exudado), en los niveles de 25OH vitamina D (son más bajos en los trasudados) y en el porcentaje de pacientes con hipovitaminosis severa (tienen más hipovitaminosis severa los trasudados).

Tabla 5.6. Diferencias entre trasudados y exudados (los porcentajes de la primera línea de la tabla, hacen referencia al total de líquidos pleurales incluidos inicialmente).

	TRASUDADO	EXUDADO	p
Número de Pacientes n(%)	45(27,3%)	107(65,5%)	
Edad (media+/-desviación estándar) (años)	<b>74+/-15</b>	<b>67+/-17</b>	<b>p=0,01</b>
Varones n(%)	17(46%)	71(61%)	P=0,40
25OH vitamina D (ng/ml) (media+/-desviación estándar)	<b>12,75+/-7,57</b>	<b>16,09+/-10,26</b>	<b>P=0,019</b>
Déficit n(%)	35(77%)	75(65%)	P=0,08
Déficit severo n(%)	<b>18(40%)</b>	<b>24(24%)</b>	<b>P=0,01</b>

En resumen:

*Los pacientes con DP tipo trasudado tienen niveles más bajos de 25OH vitamina D en sangre y mayor prevalencia de hipovitaminosis grave que los DP tipo exudado.*

### 5.3 METABOLITOS DE LA VITAMINA D y VDBP EN SUERO Y LÍQUIDO PLEURAL EN LOS PACIENTES CON DERRAMES PLEURALES

#### 5.3.1 SEGÚN LA CAUSA DEL DERRAME PLEURAL

La Tabla 5.7 presenta los niveles de 25OH vitamina D, 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D y VDBP en suero y líquido pleural y el cociente de sus niveles en líquido pleural/suero (LP/S) en los tres grupos de derrames pleurales estudiados. Tras una comparación global (test de Kruskal-Wallis) (Tabla 5.7), en los casos en los que se detectaron diferencias se hizo una comparación grupo a grupo mediante el test U de Mann-Whitney cuyos resultados se presentan en las tablas 5.8, 5.9 y 5.10. Asimismo se presentan en forma gráfica las diferencias estadísticamente significativas en las figuras 5.8 a 5.18.

Tabla 5.7. Diferencias en las moléculas relacionadas con la vitamina D entre los tres tipos etiológicos de derrame pleural

	CARDIACO		TUMORAL		INFECCIOSO		P
	n	mediana (mínimo, máximo)	n	mediana (mínimo, máximo)	n	mediana (mínimo, máximo)	
<b>25OH Vitamina D suero ng/ml</b>	<b>39</b>	<b>10,4 (3-39,6)</b>	<b>34</b>	<b>18,4 (6,9-41)</b>	<b>43</b>	<b>12 (5-84)</b>	<b>p=0,001</b>
<b>25OH Vitamina D liquido pleural ng/ml</b>	<b>35</b>	<b>12,2 (1-30,5)</b>	<b>35</b>	<b>17 (5,5-47)</b>	<b>43</b>	<b>16 (1-63)</b>	<b>p=0,016</b>
Cociente de 25OH Vitamina D LP/S	34	1,16 (0,39-1,78)	33	1,16 (0,39-1,78)	37	1,33 (0,16-3,36)	p=0,261
<b>1, 25(OH)2 vitamina D suero pg/ml</b>	<b>26</b>	<b>22,5 (5-116)</b>	<b>21</b>	<b>46 (9-140)</b>	<b>26</b>	<b>25,65 (7-113)</b>	<b>p=0,043</b>
<b>1,25(OH)2 Vitamina D liquido pleural pg/ml</b>	<b>25</b>	<b>12 (2-52)</b>	<b>20</b>	<b>31,5 (6-89)</b>	<b>25</b>	<b>22 (4-132)</b>	<b>p=0,001</b>
<b>Cociente de 1,25(OH)2 Vitamina D LP/S</b>	<b>25</b>	<b>0,58 (0,04-1,18)</b>	<b>20</b>	<b>0,69 (0,4-1,28)</b>	<b>25</b>	<b>0,78 (0,17-2,82)</b>	<b>p=0,022</b>
VDBP suero mg/l	38	197,35 (27,69-1122,07)	32	275,10 (13,13-730,36)	42	203,19 (29,82-494,7)	p=0,1
<b>VDBP liquido pleural mg/l</b>	<b>34</b>	<b>95,43 (10-446,04)</b>	<b>31</b>	<b>191,07 (5,56-464,32)</b>	<b>39</b>	<b>134,05 (4,24-834,29)</b>	<b>p=0,001</b>
<b>Cociente de VDBP LP/S</b>	<b>34</b>	<b>0,42 (0,06-1,43)</b>	<b>31</b>	<b>0,68 (0,37-2,05)</b>	<b>39</b>	<b>0,66 (0,03-5,52)</b>	<b>p=0,001</b>

Tabla 5.8. Diferencias en las moléculas relacionadas con la vitamina D entre los derrames pleurales cardíacos y tumorales.

	CARDIACO		TUMORAL		p
	n	mediana (mínimo, máximo)	n	mediana (mínimo, máximo)	
<b>25OH Vitamina D suero ng/ml</b>	<b>39</b>	<b>10,4 (3-39,6)</b>	<b>34</b>	<b>18,4 (6,9-41)</b>	<b>p=0,000</b>
<b>25OH Vitamina D liquido pleural ng/ml</b>	<b>35</b>	<b>12,2 (1-30,5)</b>	<b>35</b>	<b>17 (5,5-47)</b>	<b>p=0,003</b>
Cociente de 25OH Vitamina D LP/S	34	1,16 (0,39-1,78)	33	1,16 (0,39-1,78)	p=1,00
<b>1, 25(OH)2 vitamina D suero pg/ml</b>	<b>26</b>	<b>22,5 (5-116)</b>	<b>21</b>	<b>46 (9-140)</b>	<b>p=0,041</b>
<b>1,25(OH)2 Vitamina D liquido pleural pg/ml</b>	<b>25</b>	<b>12 (2-52)</b>	<b>20</b>	<b>31,5 (6-89)</b>	<b>p=0,000</b>
Cociente de 1,25(OH)2 Vitamina D LP/S	25	0,58 (0,04-1,18)	20	0,69 (0,4-1,28)	p=0,058
VDBP suero mg/l	38	197,35 (27,69-1122,07)	32	275,10 (13,13-730,36)	p=0,588
<b>VDBP liquido pleural mg/l</b>	<b>34</b>	<b>95,43 (10-446,04)</b>	<b>31</b>	<b>191,07 (5,56-464,32)</b>	<b>p=0,019</b>
<b>Cociente de VDBP LP/S</b>	<b>34</b>	<b>0,42 (0,06-1,43)</b>	<b>31</b>	<b>0,68 (0,37-2,05)</b>	<b>p=0,000</b>

Figura 5.8. Niveles de 25OH Vitamina D en suero en los derrames tumorales y cardíacos.

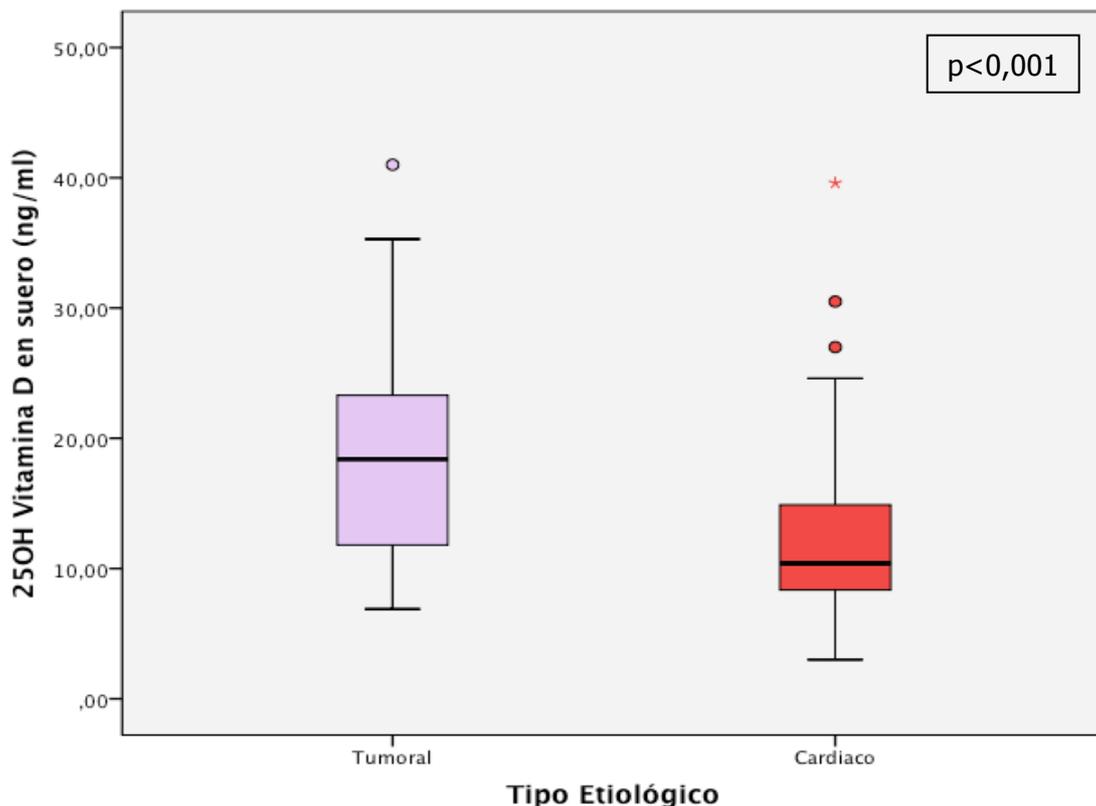


Figura 5.9. Niveles de 25OH Vitamina D en líquido pleural de los derrames tumorales y cardiacos.

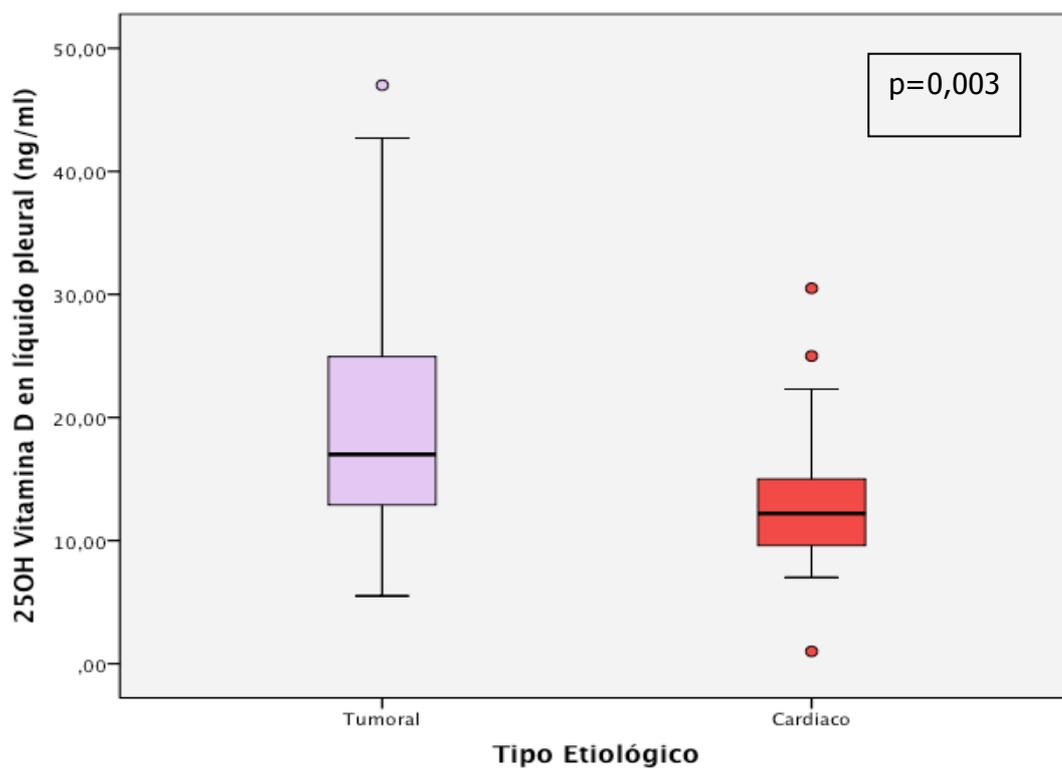


Figura 5.10. Niveles de 1,25(OH)2 Vitamina D en suero en derrames tumorales y cardiacos.

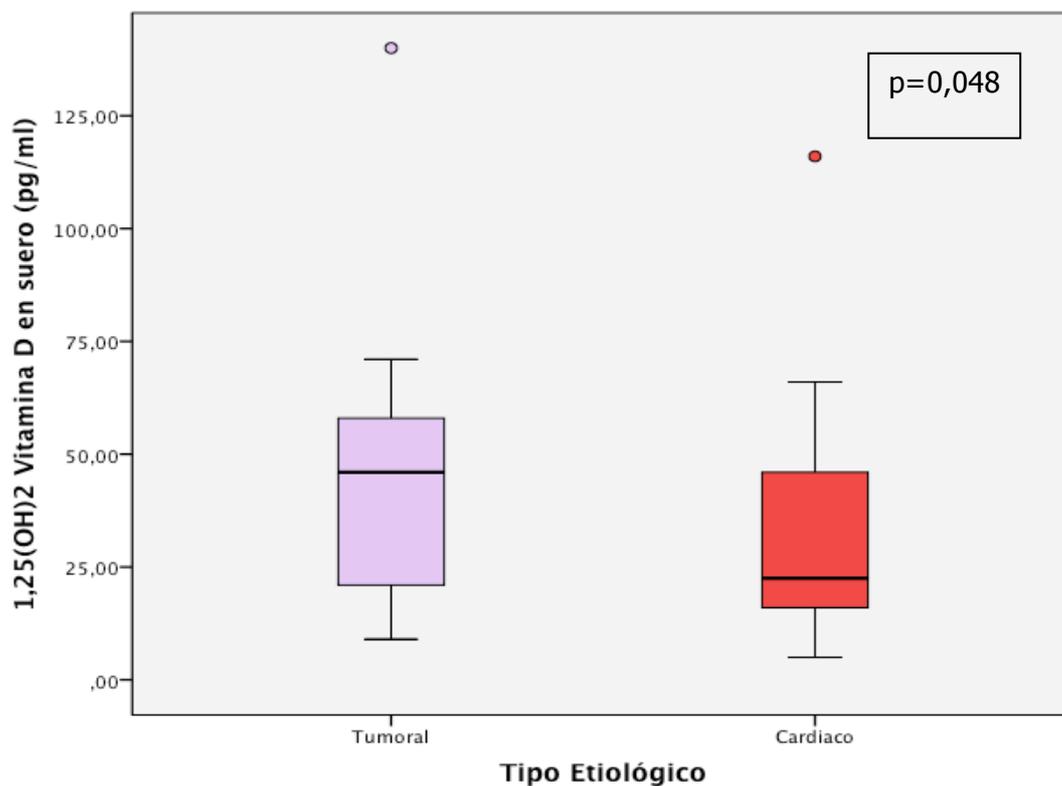


Figura 5.11. Niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamina D en líquido pleural en derrames tumorales y cardiacos.

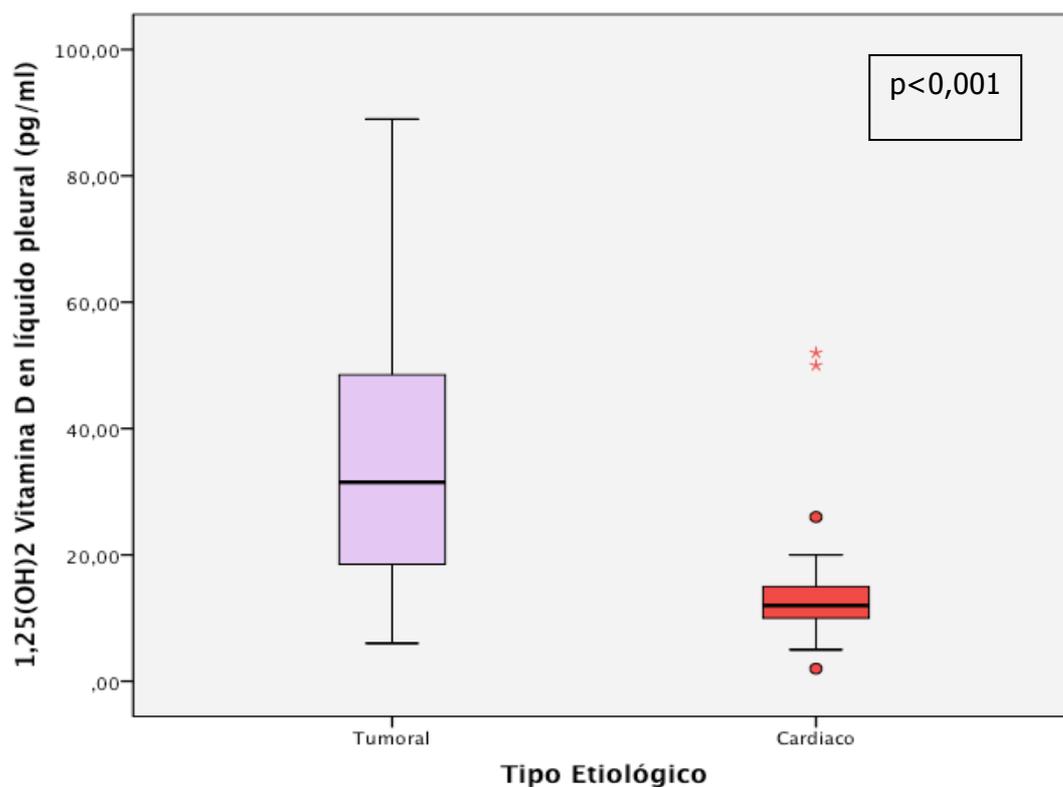


Figura 5.12. Niveles de VDBP en líquido pleural en derrames tumorales y cardiacos.

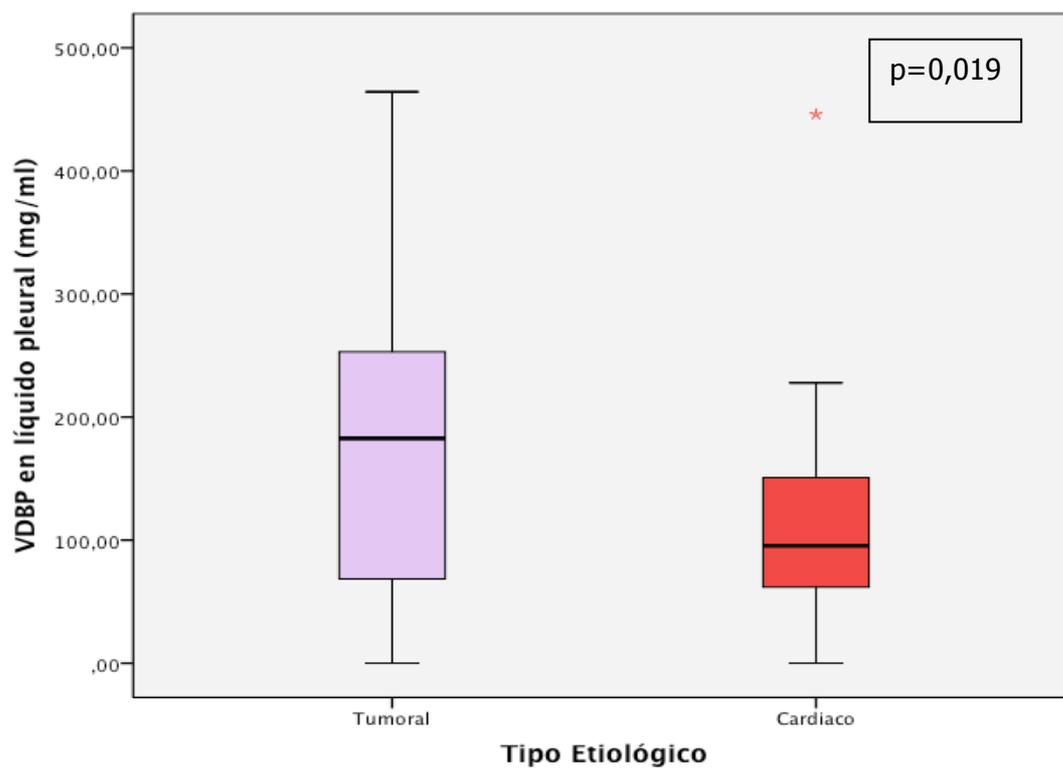


Figura 5.13. Cocientes de VDBP en LP/S en derrames tumorales y cardiacos.

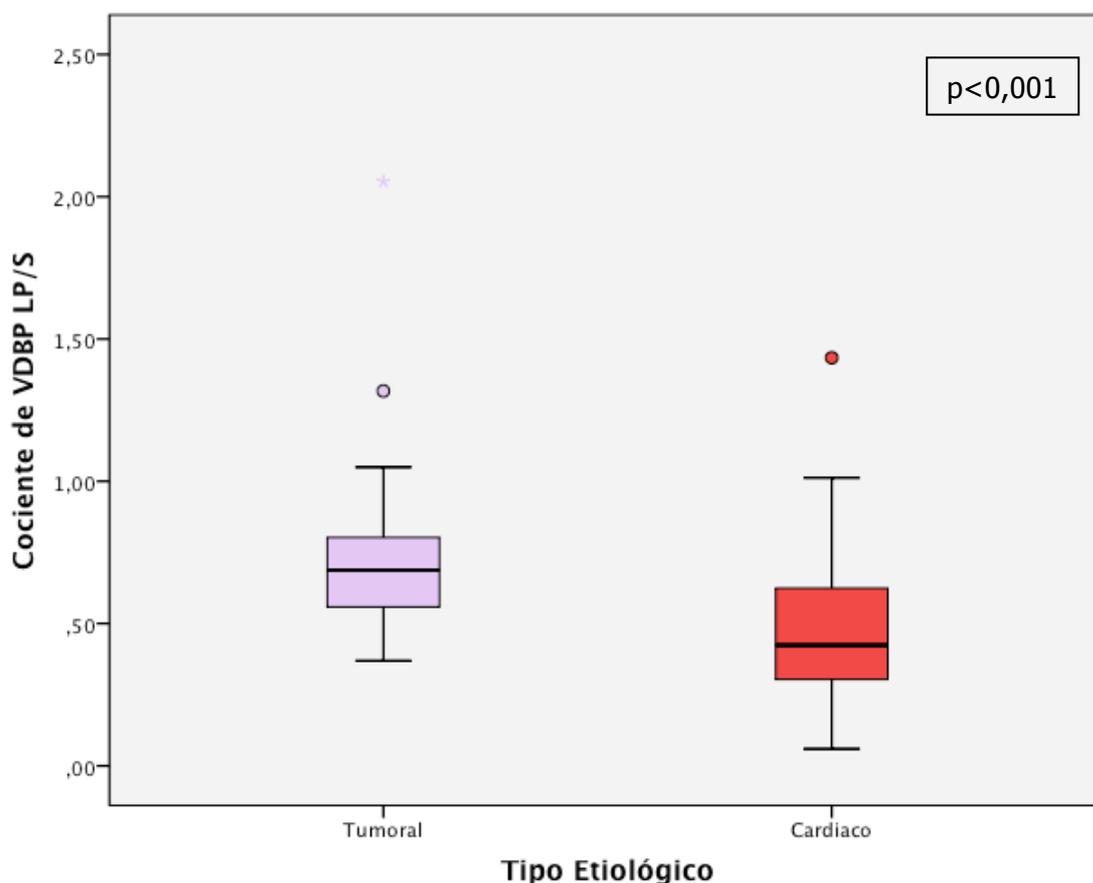


Tabla 5.9. Diferencias en las moléculas relacionadas con la vitamina D entre los derrames cardiacos e infecciosos.

	CARDIACO		INFECCIOSO		p
	n	mediana (mínimo, máximo)	n	mediana (mínimo, máximo)	
25OH Vitamina D suero ng/ml	39	10,4 (3-39,6)	43	12 (5-84)	p=0,294
25OH Vitamina D liquido pleural ng/ml	35	12,2 (1-30,5)	43	16 (1-63)	p=0,091
Cociente de 25OH Vitamina D LP/S	34	1,16 (0,39-1,78)	37	1,33 (0,16-3,36)	p=0,149
1, 25(OH)2 vitamina D suero pg/ml	26	22,5 (5-116)	26	25,65 (7-113)	p=0,840
<b>1,25(OH)2 Vitamina D liquido pleural pg/ml</b>	<b>25</b>	<b>12 (2-52)</b>	<b>25</b>	<b>22 (4-132)</b>	<b>p=0,033</b>
<b>Cociente de 1,25(OH)2 Vitamina D LP/S</b>	<b>25</b>	<b>0,58 (0,04-1,18)</b>	<b>25</b>	<b>0,78 (0,17-2,82)</b>	<b>p=0,010</b>
VDBP suero mg/l	38	197,35 (27,69-1122,07)	42	203,19 (29,82-494,7)	p=0,58
VDBP liquido pleural mg/l	34	95,43 (10-446,04)	39	134,05 (4,24-834,29)	p=0,873
<b>Cociente de VDBP LP/S</b>	<b>34</b>	<b>0,42 (0,06-1,43)</b>	<b>39</b>	<b>0,66 (0,03-5,52)</b>	<b>p=0,007</b>

Figura 5.14. Niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamina D en líquido pleural en derrames infecciosos y cardiacos.

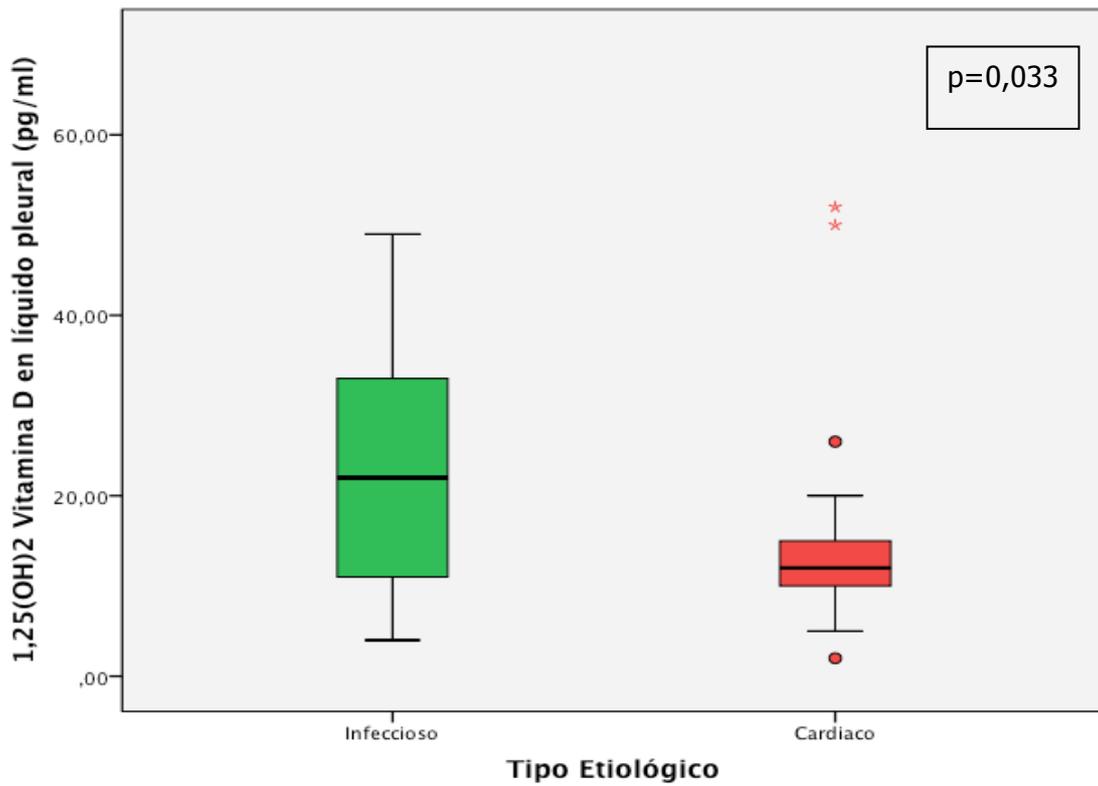


Figura 5.15. Cociente de los niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamina D en LP/S en derrames infecciosos y cardiacos.

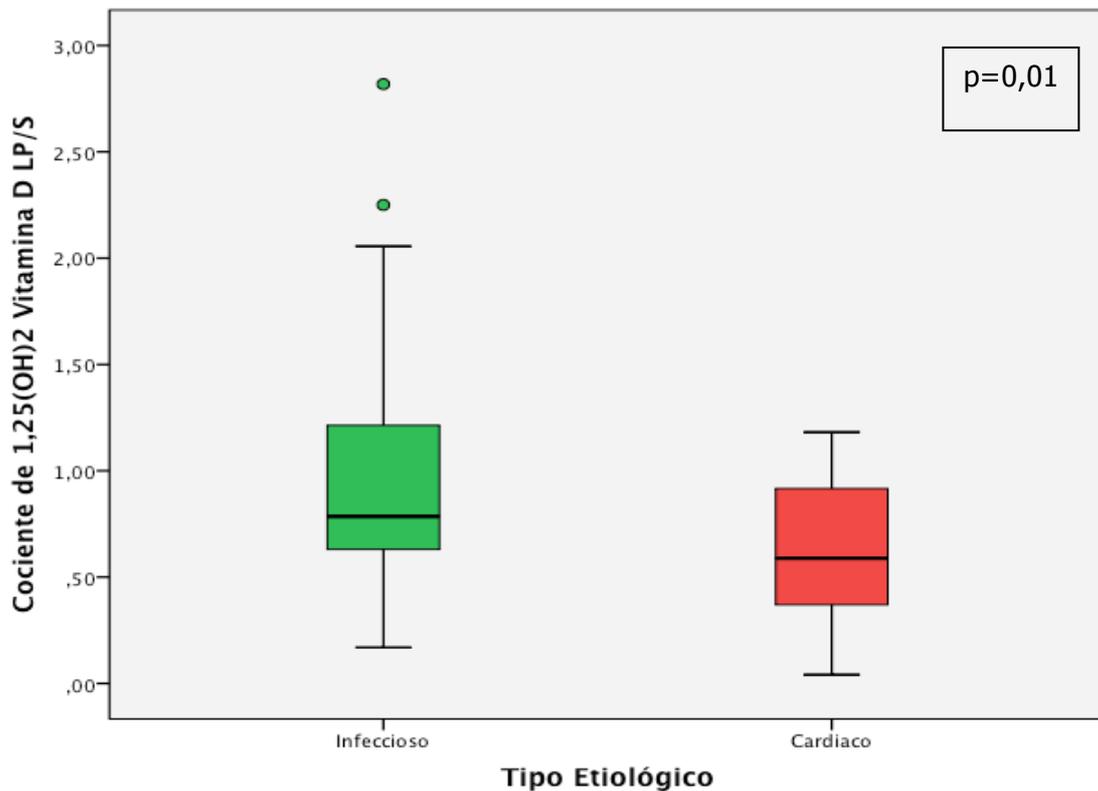


Figura 5.16. Cociente de los niveles de VDBP en LP/S en derrames infecciosos y cardiacos.

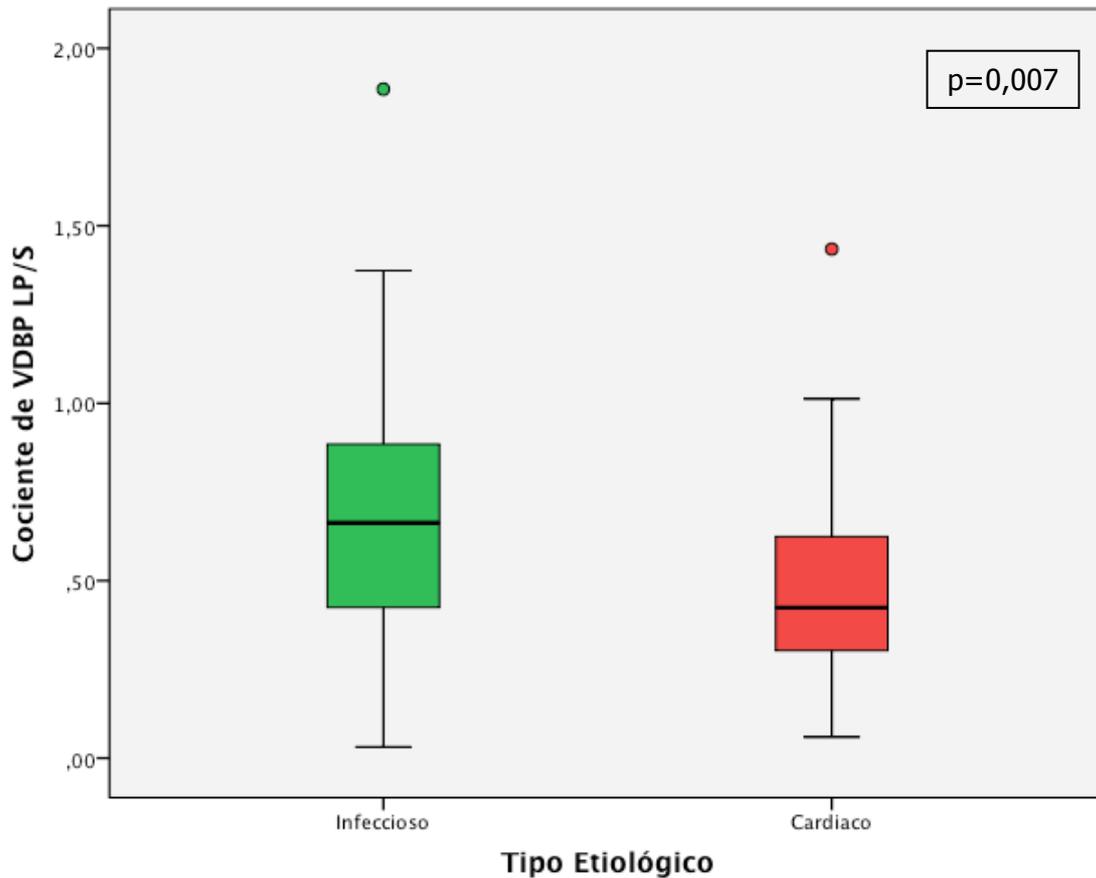


Tabla 5.10. Diferencias entre los Derrames Tumorales e Infecciosos.

	TUMORAL		INFECCIOSO		p
	n	mediana (mínimo, máximo)	n	mediana (mínimo, máximo)	
<b>25OH Vitamina D suero ng/ml</b>	<b>34</b>	<b>18,4 (6,9-41)</b>	<b>43</b>	<b>12 (5-84)</b>	<b>p=0,01</b>
25OH Vitamina D liquido pleural ng/ml	35	17 (5,5-47)	43	16 (1-63)	p=0,289
Cociente de 25OH Vitamina D LP/S	33	1,16 (0,39-1,78)	37	1,33 (0,16-3,36)	p=0,131
<b>1, 25(OH)2 vitamina D suero pg/ml</b>	<b>21</b>	<b>46 (9-140)</b>	<b>26</b>	<b>25,65 (7-113)</b>	<b>p=0,019</b>
1,25(OH)2 Vitamina D liquido pleural pg/ml	20	31,5 (6-89)	25	22 (4-132)	p=0,062
Cociente de 1,25(OH)2 Vitamina D LP/S	20	0,69 (0,4-1,28)	25	0,78 (0,17-2,82)	p=0,337
VDBP suero mg/l	32	275,10 (13,13-730,36)	42	203,19 (29,82-494,7)	p=0,057
VDBP liquido pleural mg/l	31	191,07 (5,56-464,32)	39	134,05 (4,24-834,29)	p=0,063
Cociente de VDBP LP/S	31	0,68 (0,37-2,05)	39	0,66 (0,03-5,52)	p=0,736

Figura 5.17. Niveles de 25OH vitamina D en suero en derrames tumorales e infecciosos.

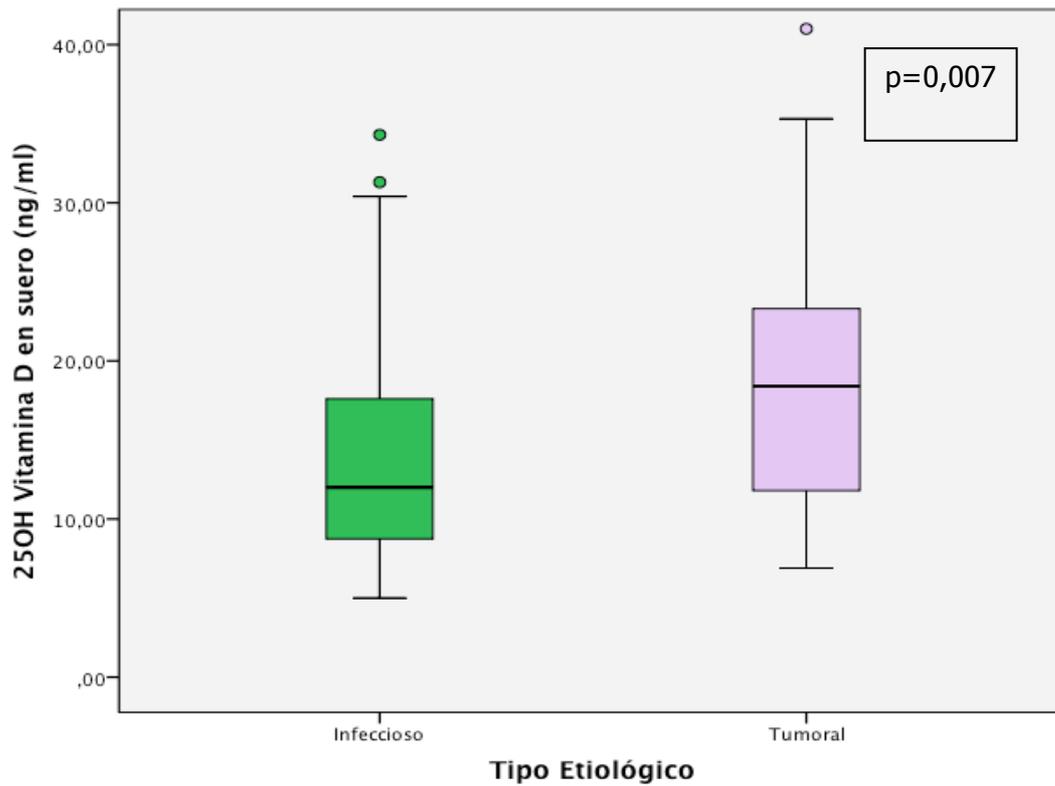
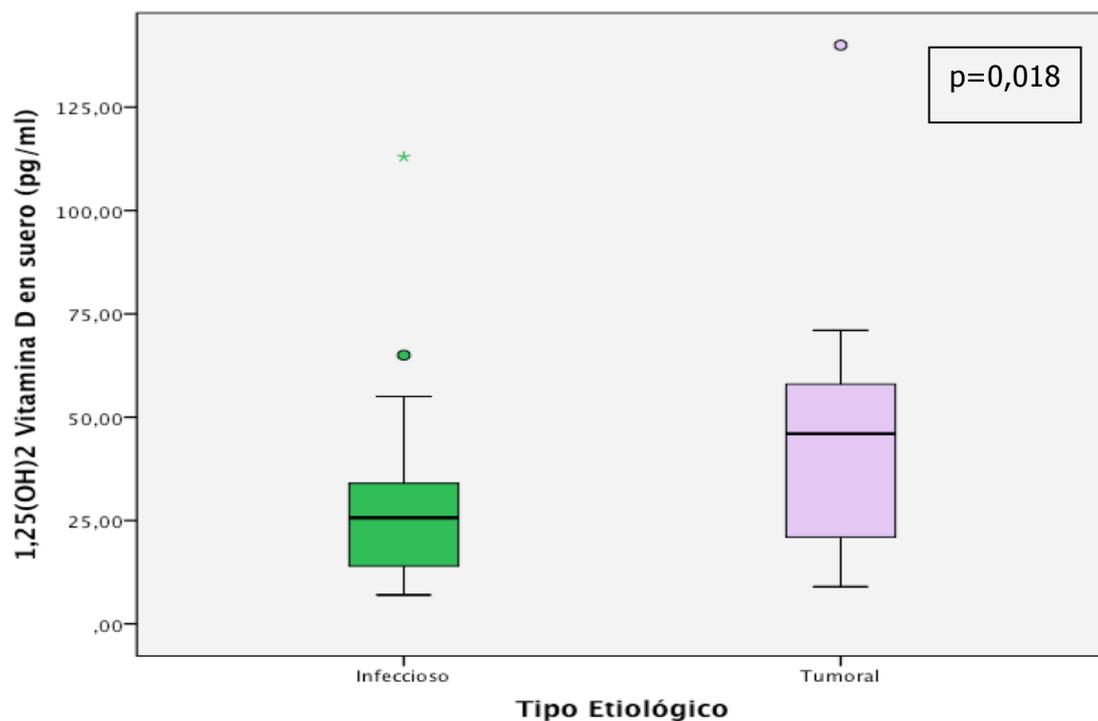


Figura 5.18. Niveles de 1,25(OH)2 vitamina D en suero en derrames tumorales e infecciosos



En resumen

*Los niveles séricos de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D son más elevados en los DPT que en los DPC o DPI.*

*No hay diferencias en los niveles séricos de VDBP entre los tres grupos.*

*Los niveles intrapleurales de 25 OH vitamina D y 1,25 (OH)<sub>2</sub> de vitamina D son más elevados en los DPT y en los DPI que en los DPC. No hay diferencias entre los DPT y DPI.*

*Los niveles intrapleurales de VDBP son más elevados en los DPT que en los DPC.*

*El cociente de los niveles de 25OH vitamina D en líquido pleural dividido entre sus niveles en sangre no es diferente entre los tres grupos.*

*El cociente de los niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D en líquido pleural dividido entre sus niveles en sangre es mayor en los DPI que en los DPC.*

*El cociente de los niveles de VDBP en líquido pleural dividido entre los niveles en sangre es mayor en los DPT que en los DPC.*

### **5.3.2 SEGÚN EL DPI SEA COMPLICADO O NO COMPLICADO**

Se estudiaron en total 51 pacientes, 32 hombres y 19 mujeres, con una edad de  $61 \pm 20$  años, que presentaban neumonía asociada a derrame pleural. Los derrames fueron clasificados como complicados utilizando el criterio clínico de la necesidad de colocación de tubo de tórax para la resolución del proceso. La decisión de tomar esta medida invasiva fue establecida libremente por el médico responsable del enfermo, basándose en criterios clínicos, probablemente matizados por las características analíticas del líquido. Para la clasificación no se utilizó la ecografía o la TAC torácica, ya que pocos enfermos tenían estas exploraciones. Finalmente se obtuvieron 37 derrames no complicados y 17 complicados, cuyos detalles bioquímicos rutinarios se

muestran en la tabla 5.11. Se observan unos niveles más bajos de pH de forma estadísticamente significativos en el grupo de pacientes con derrame pleural complicado y unos niveles más altos de LDH estadísticamente significativos en el grupo de los complicados, datos congruentes con los criterios de Light y del American College of Chest Physicians para la clasificación en derrames complicados y no complicados. Hubo 10 pacientes (71%) con niveles de 25OH vitamina D por debajo de 20 ng/ml en el grupo de los derrames pleurales complicados y 23 (62%) en el grupo de los derrames no complicados, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos mencionados. Los resultados en los niveles de 25OH Vitamina D, 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D, y VDBP en derrames complicados y no complicados, y las diferencias entre los dos grupos se muestran en la tabla 5.12.

Tabla 5.11. Parámetros bioquímicos básicos de los pacientes con derrame pleural infeccioso (DPI).

<b>Parámetro</b>		<b>DPI no complicado</b>	<b>DPI complicado</b>	<b>p</b>
Leucocitos/ $\mu$ l	Suero	10609 $\pm$ 5396	10969 $\pm$ 4457	0,834
	Pleura	550 (160, 960)	560 (160, 800)	0,761
Neutrófilos (%)	Suero	74 (65, 81)	71,5 (68, 80)	0,718
	Pleura	40 $\pm$ 29	58 $\pm$ 24	0,111
pH	Pleura	7,30 $\pm$ 0,29	7,03 $\pm$ 0,32	<b>0,028</b>
Glucosa mg/dl	Pleura	107,68 $\pm$ 47,61	78,00 $\pm$ 58	0,080
LDH U/l	Pleura	243 (121, 414)	682 (164, 1771)	<b>0,035</b>

Tabla 5.12. Diferencias en las moléculas relacionadas con la Vitamina D en los derrames complicados y no complicados.

	NO COMPLICADOS		COMPLICADOS		p
	n	mediana (mínimo, máximo)	n	mediana (mínimo, máximo)	
25OH Vitamina D suero ng/ml	30	11,85 (5,7-84),	13	13,5 (5-34,3)	p=0,731
25OH Vitamina D liquido pleural ng/ml	29	16 (6-63),	14	15 (1-51)	p=0,551
Cociente de 25OH Vitamina D LP/S	24	1,33 (0,51-3,36)	13	1,34 (0,16-2,83)	p=0,626
1, 25(OH)2 vitamina D suero pg/ml	17	22 (7-113)	9	32 (7-65)	p=0,751
1,25(OH)2 Vitamina D liquido pleural pg/ml	17	22 (5-132)	8	21,5 (4-49)	p=0,627
Cociente de 1,25(OH)2 Vitamina D LP/S	17	0,78 (0,2-2,82)	8	0,81 (0,17-2,25)	p=0,71
VDBP suero mg/l	30	228,08 (38,09-458,22)	12	179,59 (29,82-494,7)	p=0,710
VDBP liquido pleural mg/l	29	107,32 (10-834,29)	10	229,66 (4,24-327,99)	p=0,112
Cociente de VDBP LP/S	29	0,66 (0,14-1,89)	10	0,69 (0,03-5,52)	p=0,987

En resumen

*No hay diferencias en los niveles séricos o en líquido pleural de 25OH vitamina D, 1,25 (OH)2 vitamina D o VDBP al comparar los DPI complicados con los no complicados*

*Tampoco se encontraron diferencias en los cocientes LP/Suero de estas moléculas entre estos grupos.*

### 5.3.3. SEGÚN EL DERRAME SEA EXUDADO O TRASUDADO

Estos datos se muestran en la Tabla 5.13. Los diagramas de cajas de los resultados estadísticamente significativos, se muestran en las figuras 5.19-5.22.

Tabla 5.13. Diferencias en las moléculas relacionadas con la vitamina D en trasudados y exudados.

	TRASUDADOS		EXUDADOS		p
	n	mediana (mínimo, máximo)	n	mediana (mínimo, máximo)	
<b>25OH Vitamina D suero ng/ml</b>	<b>34</b>	<b>10,6 (3-39,6)</b>	<b>101</b>	<b>12,8 (5-84)</b>	<b>p=0,019</b>
<b>25OH Vitamina D liquido pleural ng/ml</b>	<b>31</b>	<b>12 (1-25)</b>	<b>101</b>	<b>15 (1-63)</b>	<b>p=0,048</b>
Cociente de 25OH Vitamina D LP/S	30	1,12 (0,12-1,79)	93	1,14 (0,16-3,63)	p=0,755
1, 25(OH)2 vitamina D suero pg/ml	23	22 (8-66)	66	25,65 (5-140)	p=0,708
<b>1,25(OH)2 Vitamina D liquido pleural pg/ml</b>	<b>22</b>	<b>12 (2-50)</b>	<b>63</b>	<b>18 (4-132)</b>	<b>p=0,030</b>
<b>Cociente de 1,25(OH)2 Vitamina D LP/S</b>	<b>22</b>	<b>0,55 (0,04-1,18)</b>	<b>63</b>	<b>0,68 (0,17-2,82)</b>	<b>p=0,046</b>
VDBP suero mg/l	33	190,93 (27,69-1122,07)	89	236,17 (13,13-730,36)	p=0,307
VDBP liquido pleural mg/l	29	95,19 (10-446,05)	87	155,46 (4,24-834,29)	p=0,48
<b>Cociente de VDBP LP/S</b>	<b>29</b>	<b>0,44 (0,06-1,43)</b>	<b>93</b>	<b>0,65 (0,03-5,52)</b>	<b>p=0,003</b>

Figura 5.19. Niveles de 25OH vitamina D en suero de exudados y trasudados.

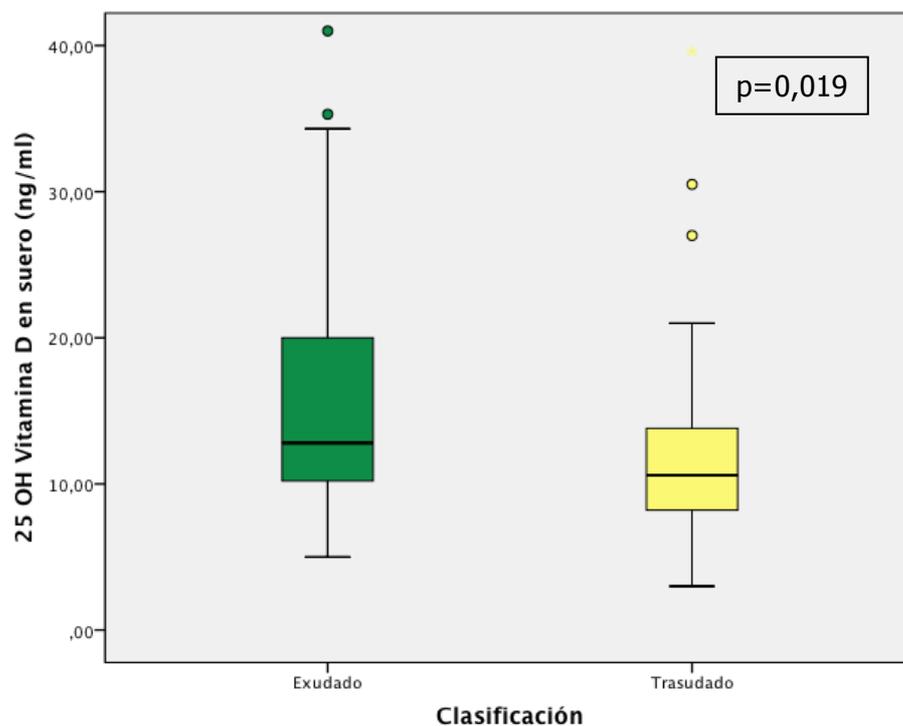


Figura 5.20. Niveles de 25OH vitamina D en líquido pleural de exudados y trasudados.

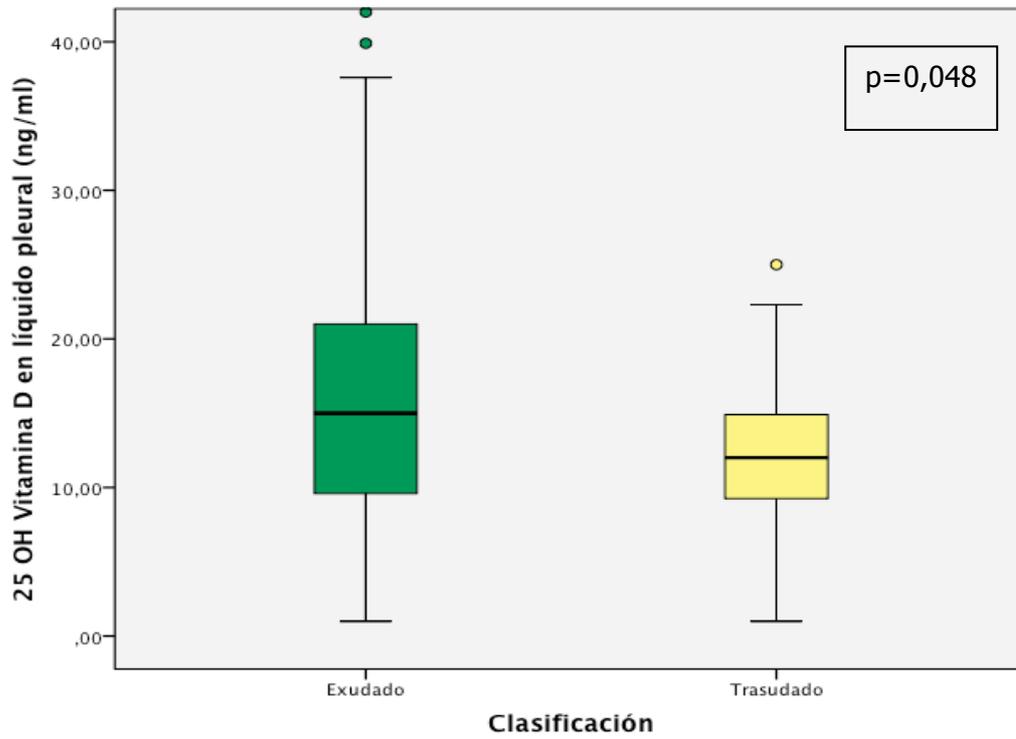


Figura 5.21. Niveles de 1,25(OH)2 vitamina D en líquido pleural de exudados y trasudados.

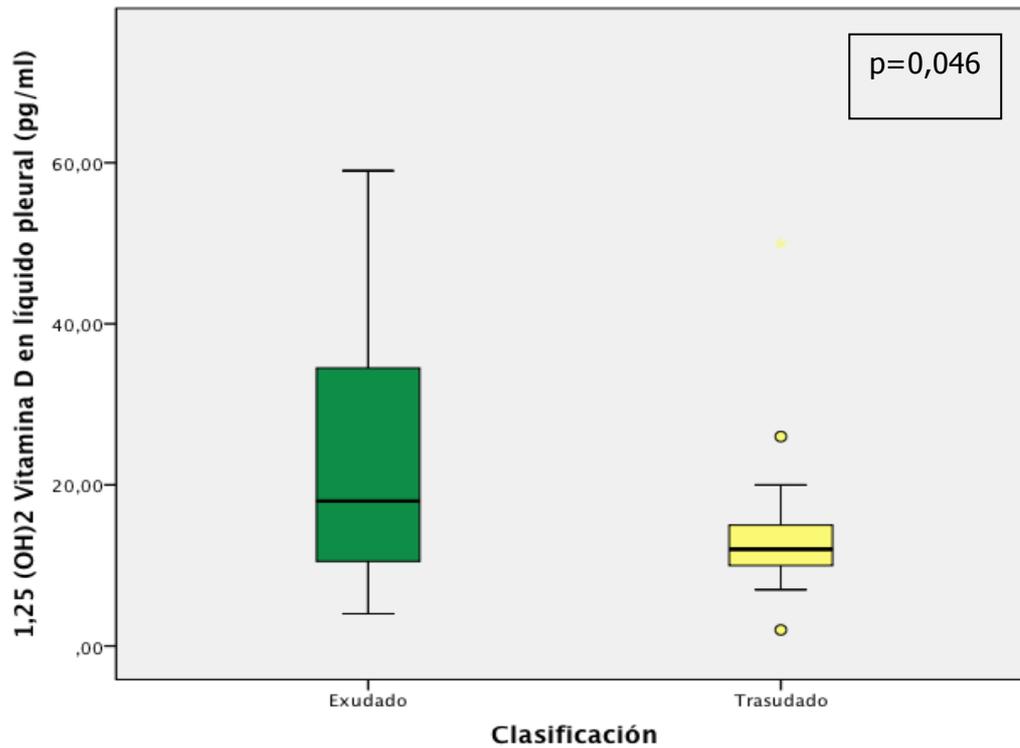
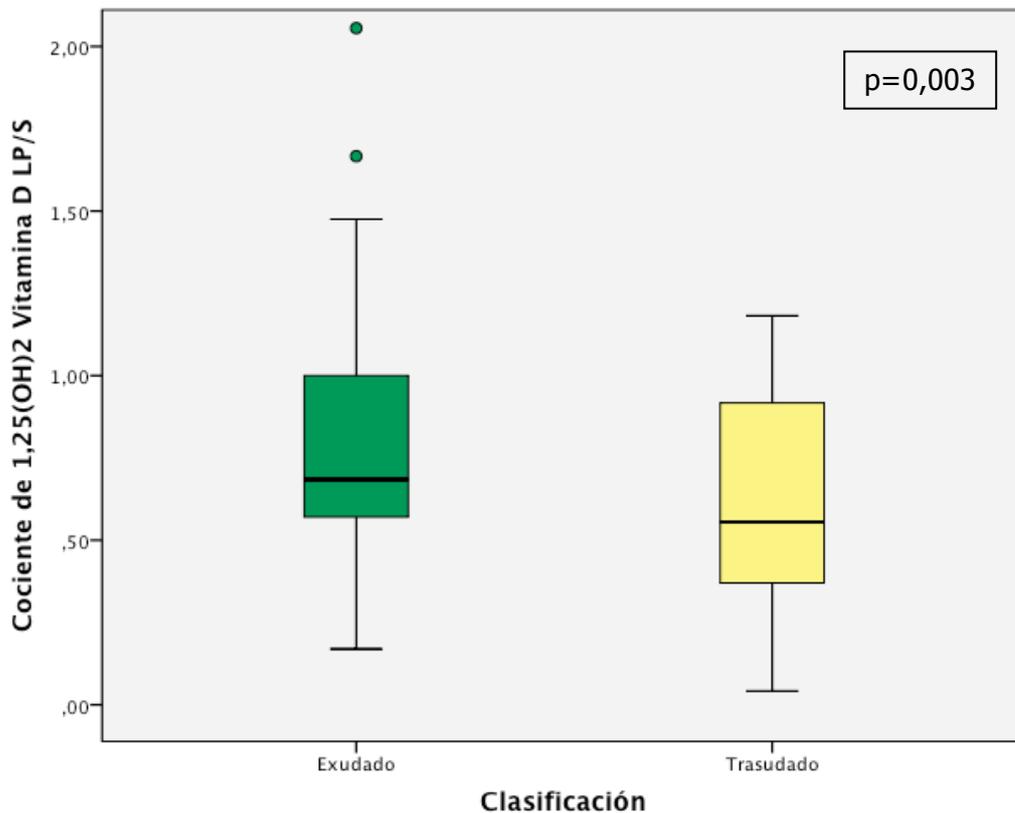


Figura 5.22. Cocientes de los niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D en LP/S de exudados y trasudados.



En resumen:

*Los pacientes con trasudado tienen menores niveles de 25OH vitamina D y de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina en LP, pero la última no es diferente en sangre.*

*La 25OH vitamina D parece pasar libremente la membrana pleural, tanto en los trasudados como en los exudados, mientras que los exudados tienen un cociente LP/S más alto de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D*

*No hay diferencias en los niveles de VDBP en suero o LP, pero hay un menor paso de esta molécula hacia la pleura en los trasudados.*

## **5.4 PÉPTIDOS ANTIBIÓTICOS VITAMINA D DEPENDIENTES EN SANGRE Y LÍQUIDO PLEURAL EN LOS PACIENTES CON DERRAME PLEURAL**

### **5.4.1. COMPARACIÓN DE CATELICIDINA EN SUERO EN PACIENTES CON DERRAME PLEURAL CON LA DE SUJETOS SANOS EMPAREJADOS POR EDAD, ZONA GEOGRÁFICA Y ÉPOCA DEL AÑO**

Utilizando los mismos grupos previamente descritos en el apartado 5.1.2. se estudiaron los niveles de catelicidina en suero en pacientes con derrame pleural y sujetos sanos. Los niveles de catelicidina en sujetos sanos expresados en mediana (mínimo, máximo) fueron de 0,62 (0,01, 12,62). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de catelicidina en suero de los pacientes con derrame pleural y sujetos sanos ( $p=0,344$ ), ni tampoco en la comparación con los distintos subgrupos etiológicos ( $p=0,502$ ).

### **5.4.2 SEGÚN LA CAUSA DEL DERRAME PLEURAL**

Los niveles de Catelicidina y  $\beta$ -2-defensina en líquido pleural y suero, el cociente de sus niveles en líquido pleural y suero, y el grado de significación de las diferencias entre los distintos grupos etiológicos, se muestran en las tablas 5.14-5.17. Los diagramas de cajas de los resultados estadísticamente significativos, se muestran en las figuras: 5.23-5.27.

Tabla 5.14. Diferencias en los niveles de Catelicidina y  $\beta$ -2-Defensina en suero, líquido pleural y sus cocientes en los distintos tipos etiológicos de DP.

	CARDIACO		TUMORAL		INFECCIOSO		p
	n	mediana (mínimo, máximo)	n	mediana (mínimo, máximo)	n	mediana (mínimo, máximo)	
Catelicidina suero ng/ml	44	0,25 (0,01-10,34)	38	0,47 (0,01-12,62)	47	0,84 (0,01-153)	p=0,017
Catelicidina líquido pleural ng/ml	44	0,3 (0,01-3,3)	38	0,52 (0,01-13,51)	49	1,42 (0,05-153)	p=0,000
Cociente de Catelicidina LP/S	44	0,91 (0,11-8,15)	38	0,93 (0,21-12)	46	1,42 (0,24-72,83)	p=0,001
$\beta$ -2-Defensina suero pg/ml	34	284,05 (9,3-1834,5)	33	224,6 (10,2-3000)	38	232,25 (14,57-2100)	p=0,966
$\beta$ -2-Defensina líquido pleural pg/ml	35	241,8 (5,8-2206)	33	276,6 (25,8-3000)	39	265,2 (6-1293,4)	p=0,706
Cociente de $\beta$ -2-Defensina LP/S	34	0,79 (0,02-197,64)	33	0,91 (0,38-8,43)	37	0,69 (0,05-26,9)	p=0,312

Tabla 5.15. Diferencias en los niveles de Catelicidina y  $\beta$ -2-Defensina en suero y líquido pleural y sus cocientes en los DP cardiacos y tumorales.

	<b>CARDIACO</b>		<b>TUMORAL</b>		<b>p</b>
	n	mediana (mínimo, máximo)	n	mediana (mínimo, máximo)	
Catelicidina suero ng/ml	44	0,25 (0,01-10,34)	38	0,47 (0,01-12,62)	p=0,180
Catelicidina liquido pleural ng/ml	44	0,3 (0,01-3,3)	38	0,52 (0,01-13,51)	p=0,208
Cociente de Catelicidina LP/S	44	0,91 (0,11-8,15)	38	0,93 (0,21-12)	p=0,922
$\beta$ -2-Defensina suero pg/ml	34	284,05 (9,3-1834,5)	33	224,6 (10,2-3000)	p=0,763
$\beta$ -2-Defensina liquido pleural pg/ml	35	241,8 (5,8-2206)	33	276,6 (25,8-3000)	p=0,380
Cociente de $\beta$ -2-Defensina LP/S	34	0,79 (0,02-197,64)	33	0,91 (0,38-8,43)	p=0,286

Tabla 5.16. Diferencias en los niveles de Catelicidina y  $\beta$ -2-Defensina en suero y líquido pleural y sus cocientes en los DP cardiacos e infecciosos.

	<b>CARDIACO</b>		<b>INFECCIOSO</b>		<b>p</b>
	n	mediana (mínimo, máximo)	n	mediana (mínimo, máximo)	
<b>Catelicidina suero ng/ml</b>	<b>44</b>	<b>0,25 (0,01-10,34)</b>	<b>47</b>	<b>0,84 (0,01-153)</b>	<b>p=0,005</b>
<b>Catelicidina liquido pleural ng/ml</b>	<b>44</b>	<b>0,3 (0,01-3,3)</b>	<b>49</b>	<b>1,42 (0,05-153)</b>	<b>p=0,000</b>
<b>Cociente de Catelicidina LP/S</b>	<b>44</b>	<b>0,91 (0,11-8,15)</b>	<b>46</b>	<b>1,42 (0,24-72,83)</b>	<b>p=0,002</b>
$\beta$ -2-Defensina suero pg/ml	34	284,05 (9,3-1834,5)	38	232,25 (14,57-2100)	p=0,906
$\beta$ -2-Defensina liquido pleural pg/ml	35	241,8 (5,8-2206)	39	265,2 (6-1293,4)	p=0,725
Cociente de $\beta$ -2-Defensina LP/S	34	0,79 (0,02-197,64)	37	0,69 (0,05-26,9)	p=0,704

Figura 5.23. Niveles de Catelicidina en suero de derrames infecciosos y cardiacos.

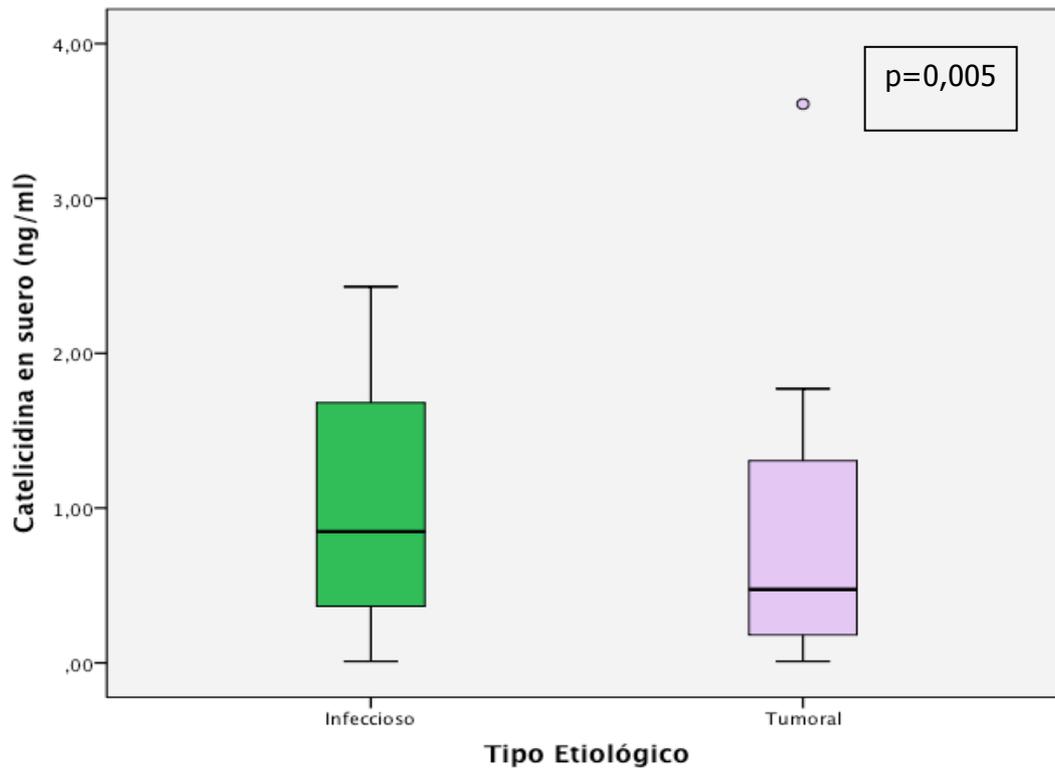


Figura 5.24. Niveles de Catelicidina en líquido pleural de derrames infecciosos y cardiacos.

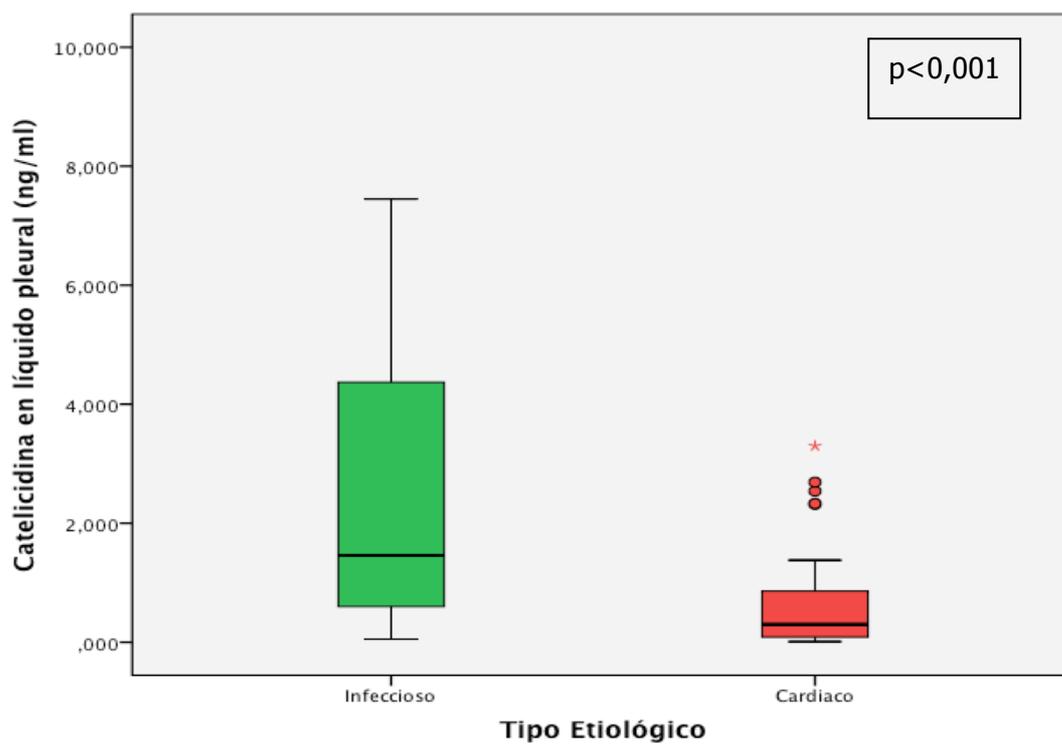


Figura 5.25. Cociente de Catelicidina en LP/S de derrames infecciosos y cardiacos.

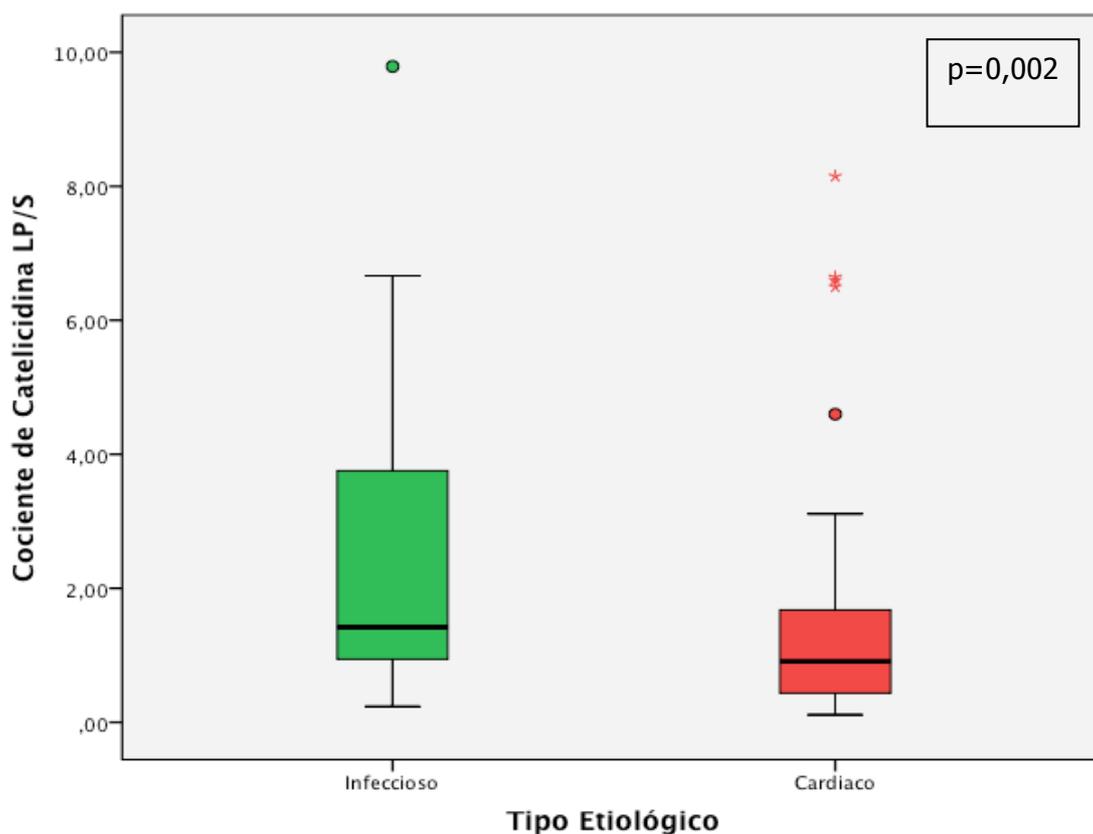


Tabla 5.17. Diferencias en los niveles de Catelicidina y  $\beta$ -2-Defensina en suero y líquido pleural y sus cocientes en los derrames tumorales e infecciosos.

	TUMORAL		INFECCIOSO		p
	n	mediana (mínimo, máximo)	n	mediana (mínimo, máximo)	
<b>Catelicidina suero ng/ml</b>	<b>38</b>	<b>0,47 (0,01-12,62)</b>	<b>47</b>	<b>0,84 (0,01-153)</b>	<b>p=0,017</b>
<b>Catelicidina liquido pleural ng/ml</b>	<b>38</b>	<b>0,52 (0,01-13,51)</b>	<b>49</b>	<b>1,42 (0,05-153)</b>	<b>p=0,000</b>
<b>Cociente de Catelicidina LP/S</b>	<b>38</b>	<b>0,93 (0,21-12)</b>	<b>46</b>	<b>1,42 (0,24-72,83)</b>	<b>p=0,001</b>
$\beta$ -2-Defensina suero pg/ml	33	224,6 (10,2-3000)	38	232,25 (14,57-2100)	p=0,940
$\beta$ -2-Defensina liquido pleural pg/ml	33	276,6 (25,8-3000)	39	265,2 (6-1293,4)	p=0,672
Cociente de $\beta$ -2-Defensina LP/S	33	0,91 (0,38-8,43)	37	0,69 (0,05-26,9)	p=0,137

Figura 5.26. Niveles de Catelicidina en suero de derrames infecciosos y tumorales.

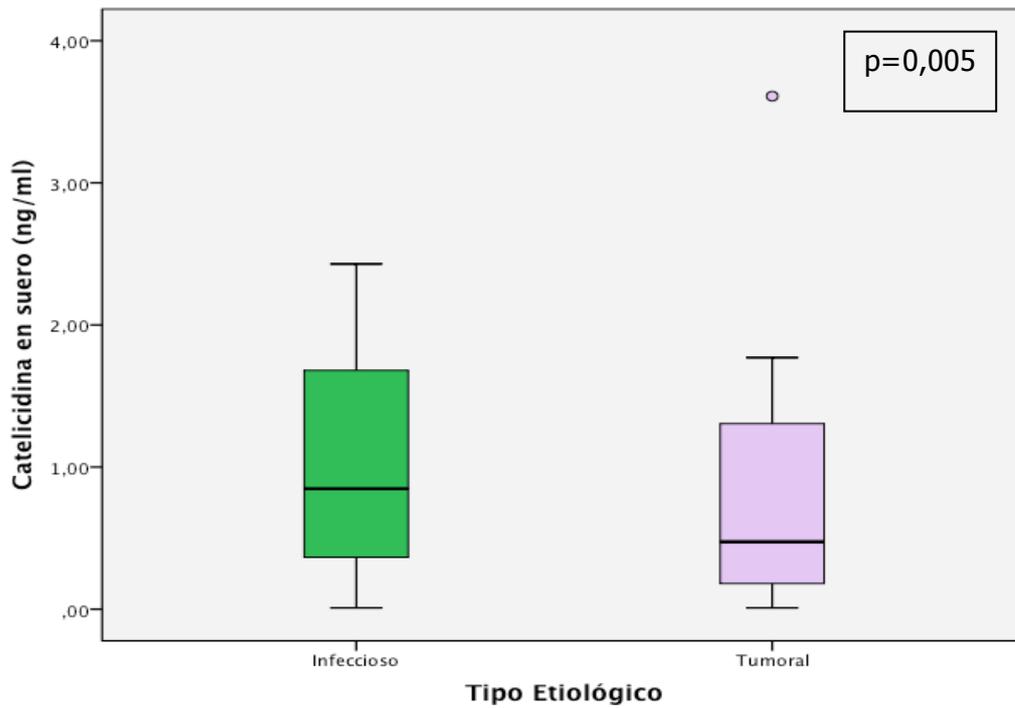


Figura 5.27. Niveles de Catelicidina en líquido pleural de derrames infecciosos y tumorales.

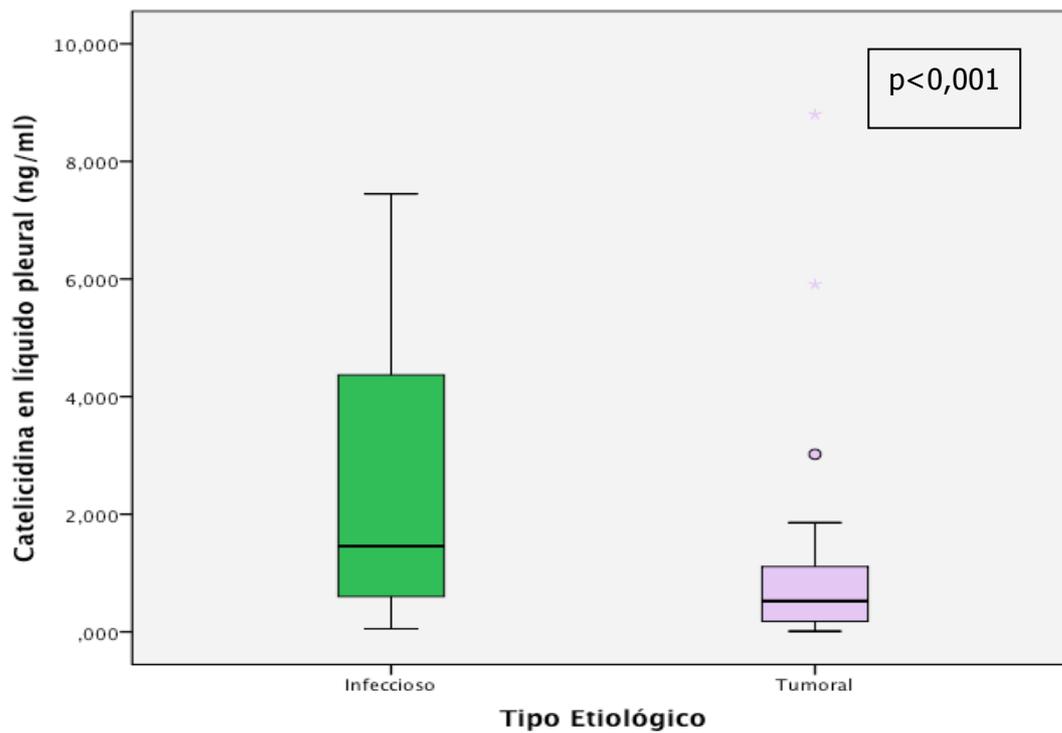
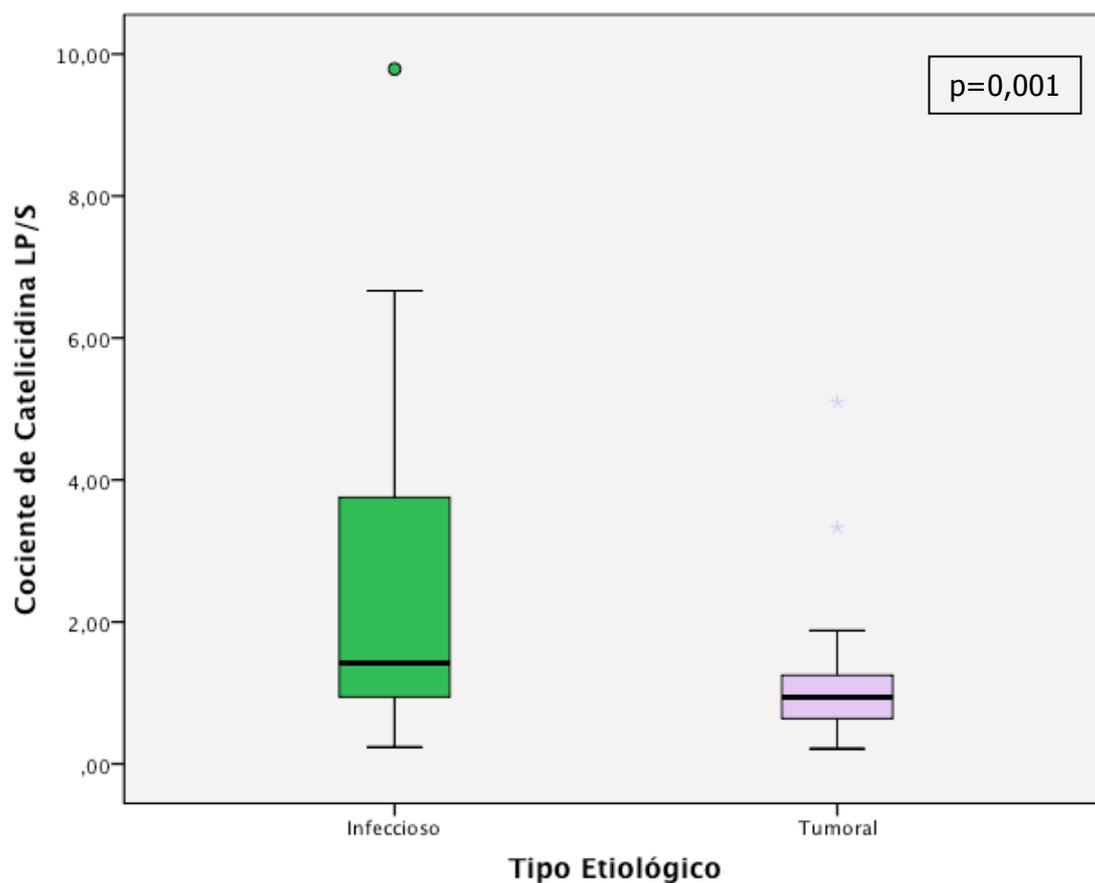


Figura 5.28. Cociente de Catelicidina en LP/S de derrames infecciosos y tumorales.



En resumen

*La catelicidina en suero o líquido pleural y el cociente de catelicidina de LP/S en sangre están aumentados en los DPI comparados con los DPC o DPT, que no son diferentes entre sí.*

*Por el contrario, no hay diferencias entre los niveles de  $\beta$ -2-defensina en suero, líquido pleural o cociente de LP/S entre los tres grupos*

### 5.4.3 SEGÚN SEA EL DPI COMPLICADO O NO COMPLICADO

Los niveles de Catelicidina y  $\beta$ -2-defensina en líquido pleural, suero y los cocientes de sus niveles en líquido pleural y suero, el grado de significación de las diferencias entre los derrames complicados y no complicados, se muestran la Tabla 5.18. Los diagramas de cajas de los resultados estadísticamente significativos, se muestran las figuras 5.29-5.31.

Tabla 5.18. Diferencias en Catelicidina y  $\beta$ -2-Defensina en suero y en líquido pleural y sus cocientes en los derrames infecciosos complicados y no complicados.

	NO COMPLICADOS		COMPLICADOS		p
	n	mediana (mínimo, máximo)	n	mediana (mínimo, máximo)	
<b>Catelicidina suero ng/ml</b>	<b>34</b>	<b>0,51 (0,01-153)</b>	<b>13</b>	<b>1,43 (0,06-4,61)</b>	<b>p=0,029</b>
<b>Catelicidina liquido pleural ng/ml</b>	<b>36</b>	<b>1,05 (0,053-153)</b>	<b>13</b>	<b>3,11 (0,92-19,4)</b>	<b>p=0,014</b>
Cociente de Catelicidina LP/S	33	1,29 (0,24-17,14)	13	1,43 (0,89-72,83)	p=0,192
<b><math>\beta</math>-2-Defensina suero pg/ml</b>	<b>26</b>	<b>431,9 (17,4-2100)</b>	<b>12</b>	<b>112,11 (14,57-1459,6)</b>	<b>p=0,023</b>
$\beta$ -2-Defensina liquido pleural pg/ml	27	383,2 (18,6-1293,4)	12	152,85 (6-1122,5)	p=0,091
Cociente de $\beta$ -2-Defensina LP/S	25	0,68 (0,22-26,9)	12	0,79 (0,05-4,78).	p=0,936

Figura 5.29. Niveles de Catelicidina en suero de derrames infecciosos complicados y no complicados.

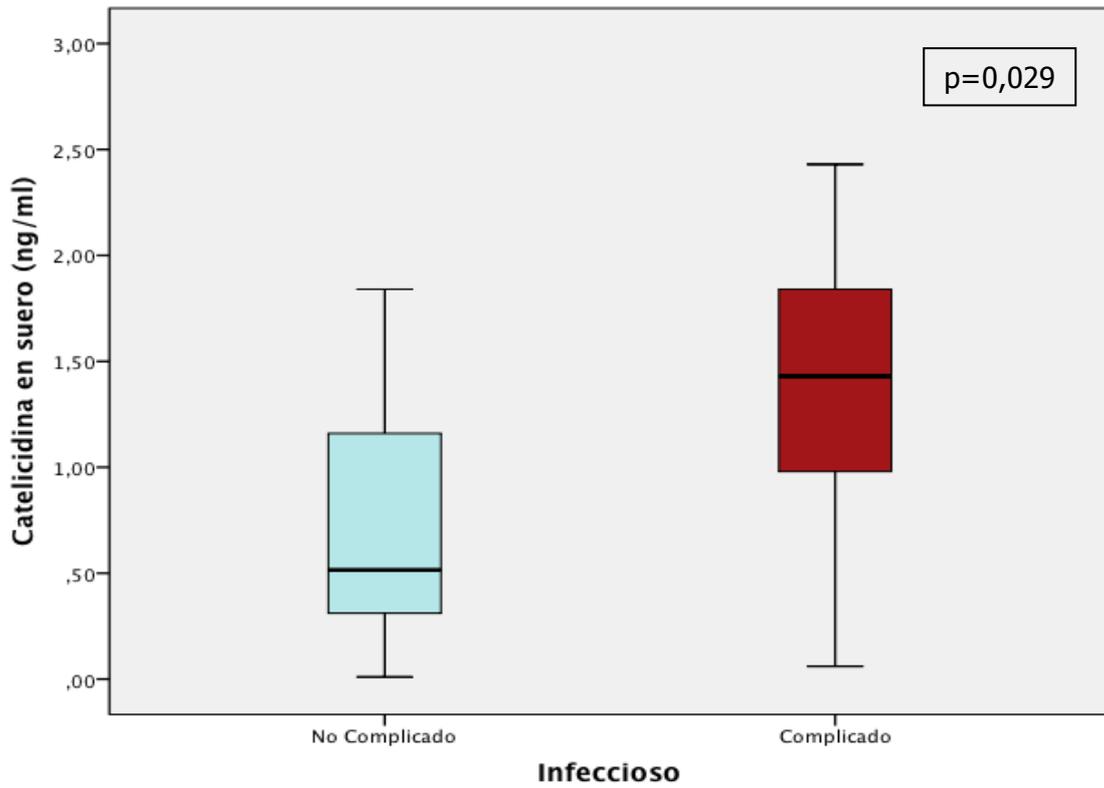


Figura 5.30. Niveles de Catelicidina en líquido pleural de derrames infecciosos complicados y no complicados.

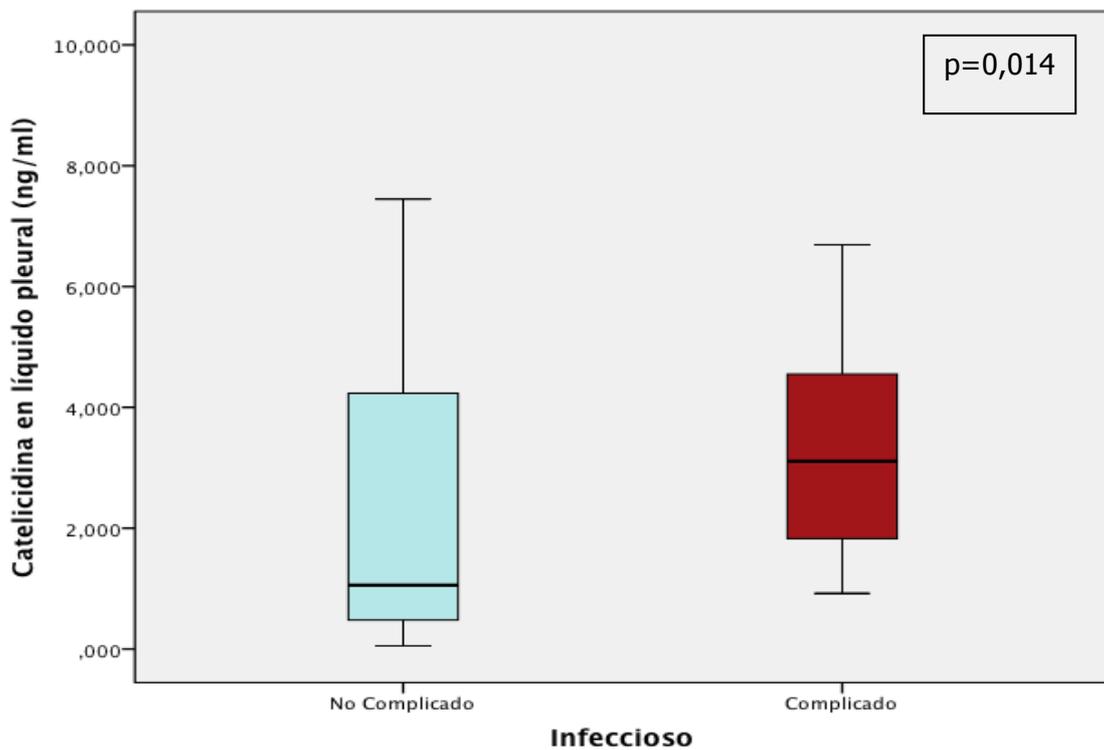
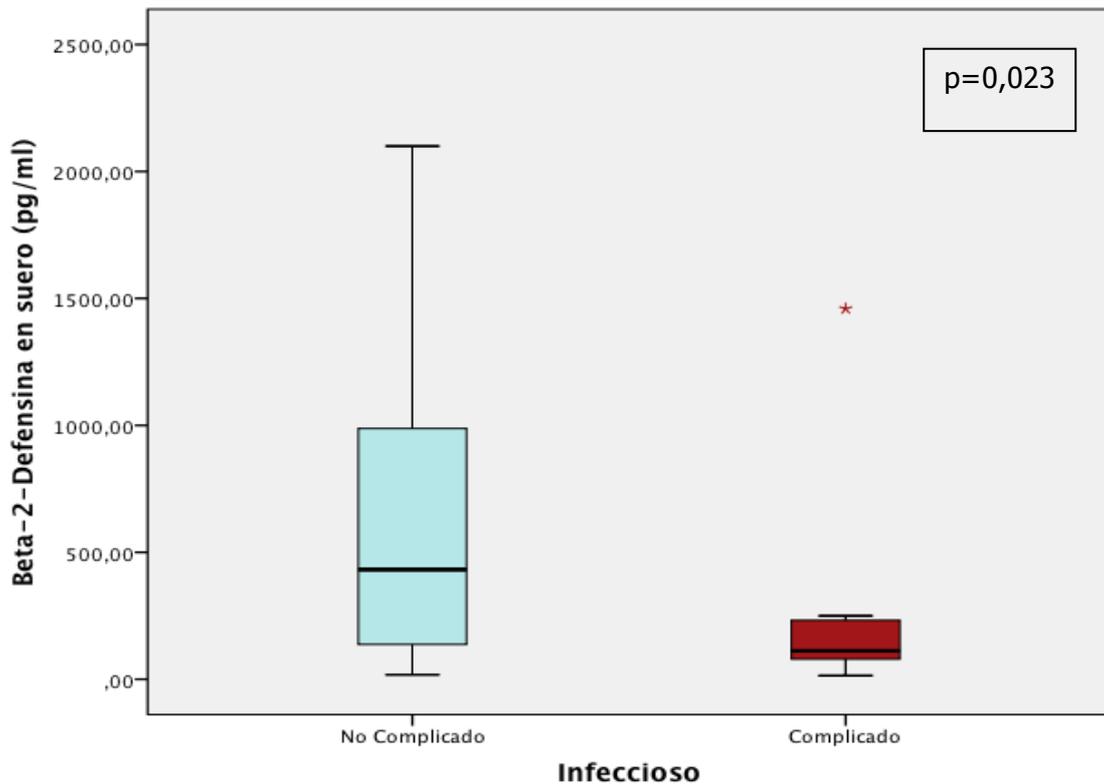


Figura 5.31. Niveles de  $\beta$ -2-Defensina en suero de derrames infecciosos complicados y no complicados.



En resumen

*La catelicidina en suero y líquido pleural es mayor en los derrames pleurales complicados que en los no complicados*

*Los niveles de  $\beta$ -2-defensina en suero son menores en los derrames pleurales complicados que en los no complicados.*

#### 5.4.4 SEGÚN EL DERRAME SEA EXUDADO O TRASUDADO

Los niveles de Catelicidina y  $\beta$ -2-defensina en líquido pleural, suero y el cociente de sus niveles en líquido pleural y suero, y el grado de significación de las diferencias entre los trasudados y exudados, se muestran la Tabla 5.19. Los diagramas de cajas de los resultados estadísticamente significativos, se muestran las figuras 5.31-5.33.

Tabla 5.19. Niveles de Catelicidina y  $\beta$ -2-Defensina en suero y en líquido pleural y sus cocientes en los exudados y trasudados.

	TRASUDADOS		EXUDADOS		p
	n	mediana (mínimo, máximo)	n	mediana (mínimo, máximo)	
<b>Catelicidina suero ng/ml</b>	<b>45</b>	<b>0,24 (0,01-10,3)</b>	<b>103</b>	<b>0,67 (0,01-153)</b>	<b>p=0,17</b>
<b>Catelicidina liquido pleural ng/ml</b>	<b>45</b>	<b>0,30 (0,01-3,3)</b>	<b>105</b>	<b>0,91 (0,01-153)</b>	<b>p=0,000</b>
<b>Cociente de Catelicidina LP/S</b>	<b>45</b>	<b>0,90 (0,11-8,15)</b>	<b>102</b>	<b>1,06 (0,21-72,83)</b>	<b>p=0,001</b>
$\beta$ -2-Defensina suero pg/ml	30	258,9 (9,5-1834,5)	94	213,5 (9,3-3000)	p=0,651
$\beta$ -2-Defensina liquido pleural pg/ml	30	214,45 (5,8-2206)	95	240,5 (6-3000)	p=0,484
Cociente de $\beta$ -2-Defensina LP/S	30	0,82 (0,02-197,64)	92	0,84 (0,05-77,13).	p=0,995

Figura 5.32. Niveles de Catelicidina en suero de exudados y trasudados.

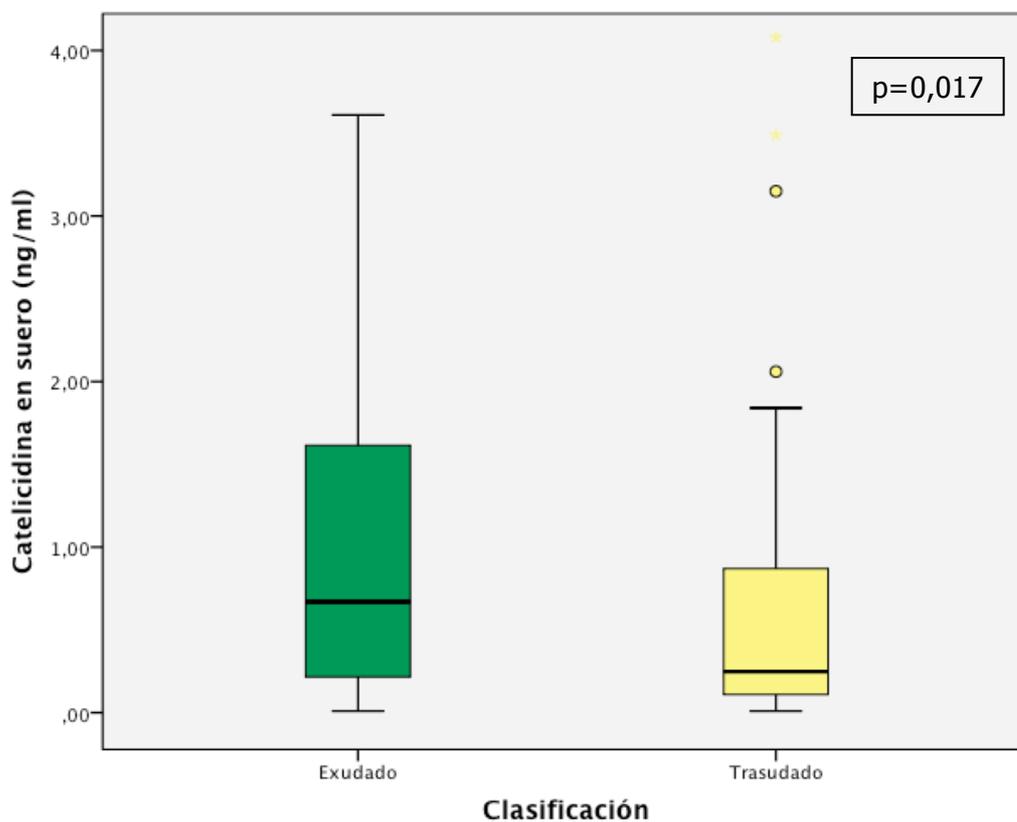


Figura 5.33. Niveles de Catelicidina en líquido pleural de exudados y trasudados.

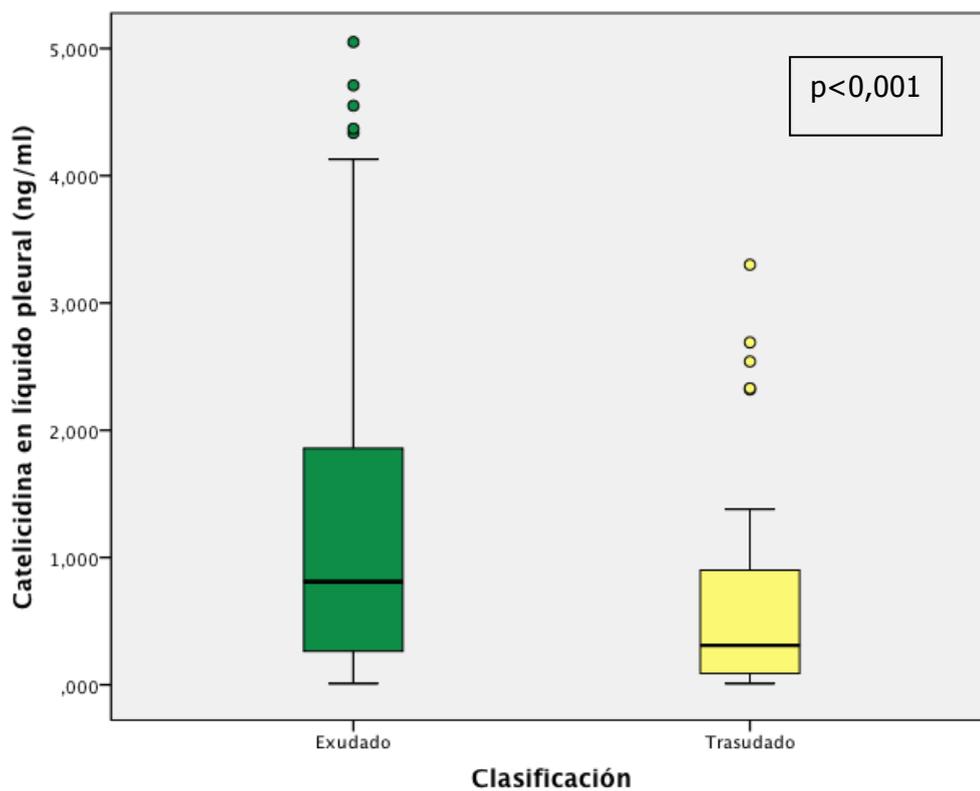
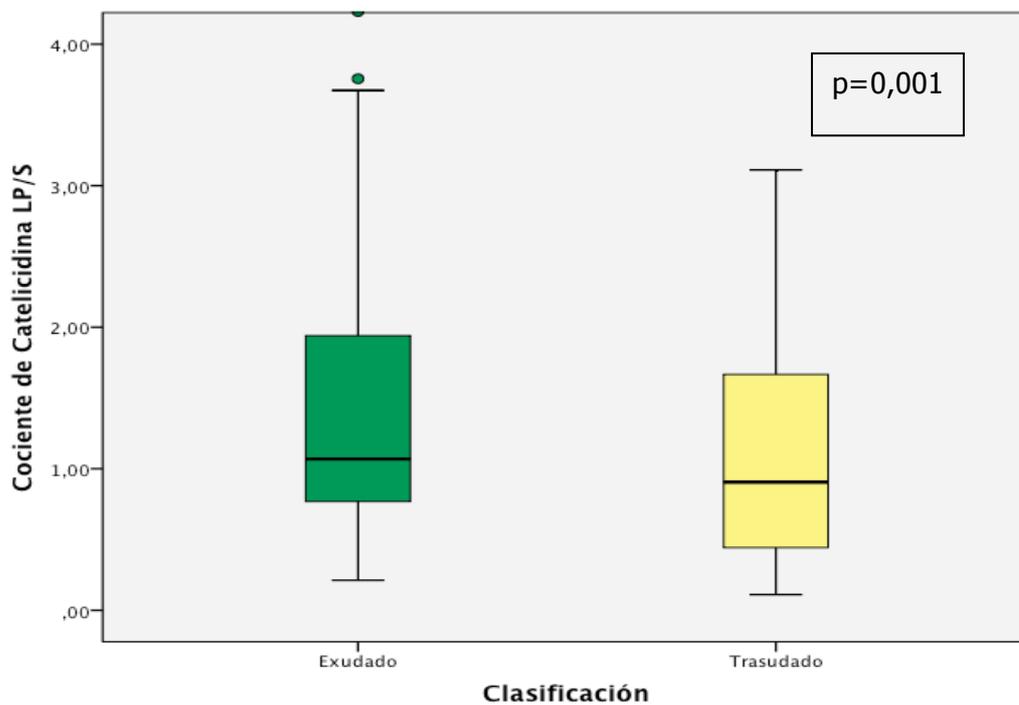


Figura 5.34. Cocientes de Catelicidina en LP/S en exudados y trasudados.



En resumen:

*La catelicidina en suero y líquido pleural, y el paso a través de la pleura es mayor en los exudados que en los trasudados.*

*Por el contrario no existen diferencias en la  $\beta$ -2-defensina en ninguno de estos parámetros.*

## 5.5 CORRELACIONES ENTRE LOS DISTINTOS PARÁMETROS

### 5.5.1 EN EL GRUPO TOTAL DE DERRAMES PLEURALES

En el grupo total los niveles de 25OH vitamina D en suero correlacionan con sus niveles en líquido pleural ( $r=0,60$ ,  $p<0,001$ ), con los de 1,25(OH) $_2$  vitamina D en suero ( $r=0,52$ ,  $p<0,001$ ) y con los de 1,25(OH) $_2$  vitamina D en líquido pleural ( $r=0,54$ ,  $p<0,001$ ). No se observa correlación con los niveles de VDBP, calcio o albúmina en suero. Los diagramas de estas correlaciones se muestran en las figuras 5.35-5.37.

Figura 5.35. Correlación entre los niveles de 25OH vitamina D en suero y líquido pleural.

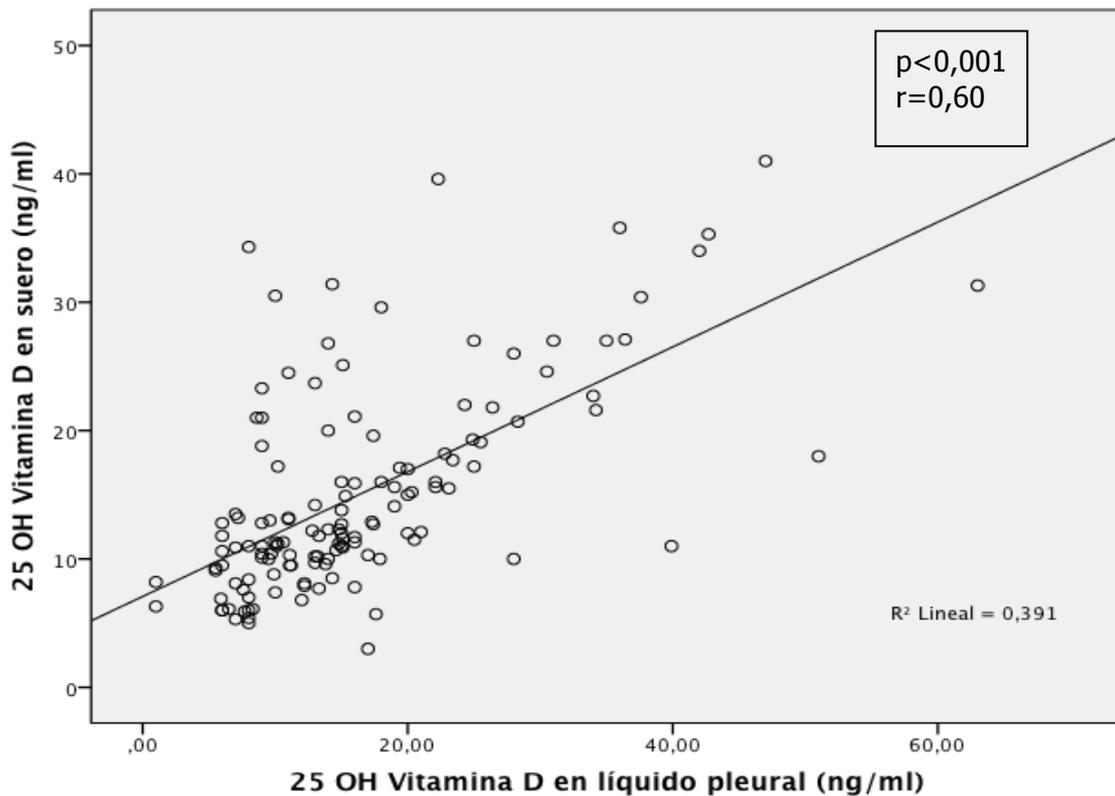
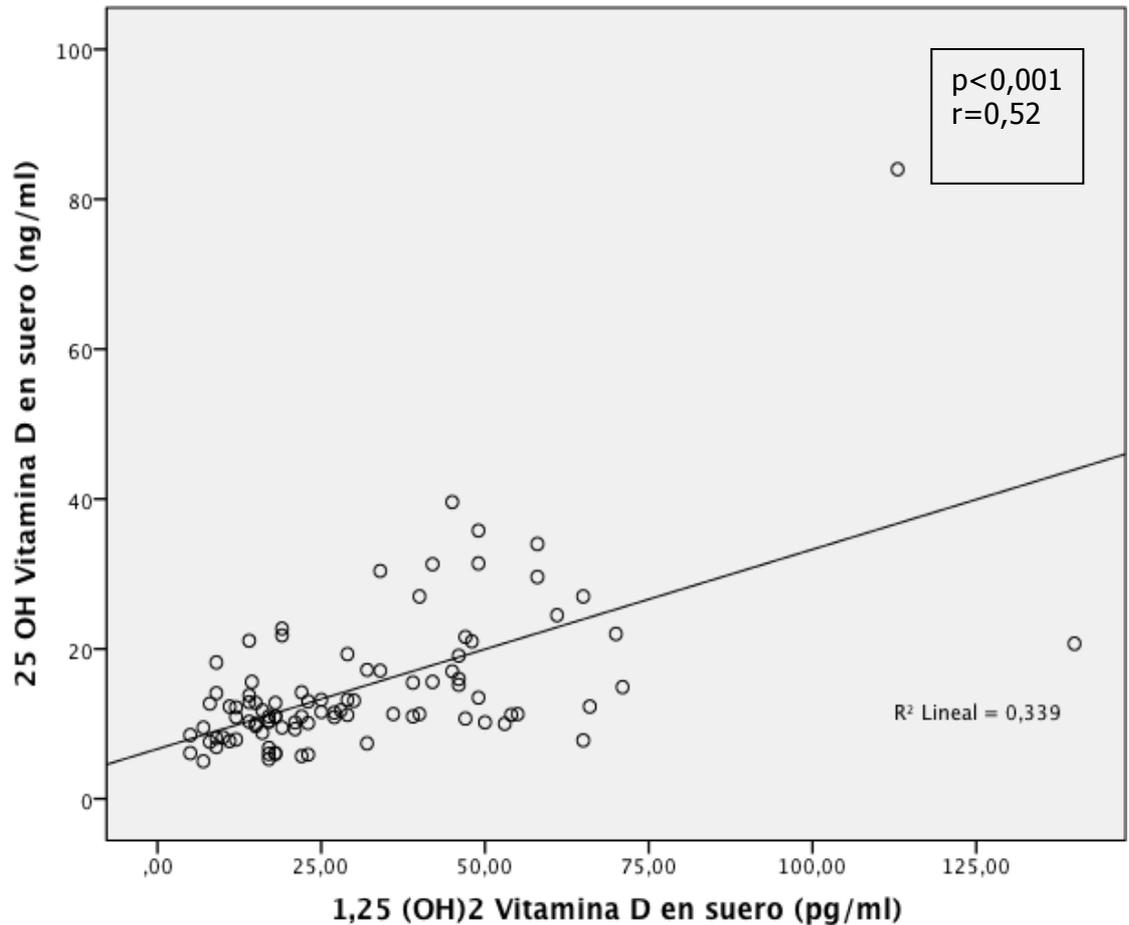


Figura 5.36. Correlación positiva entre los niveles de 25OH vitamina D en suero y 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D en suero.



Los niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D en líquido pleural correlacionan con los de VDBP en líquido pleural ( $r=0,25$ ,  $p=0,017$ ).

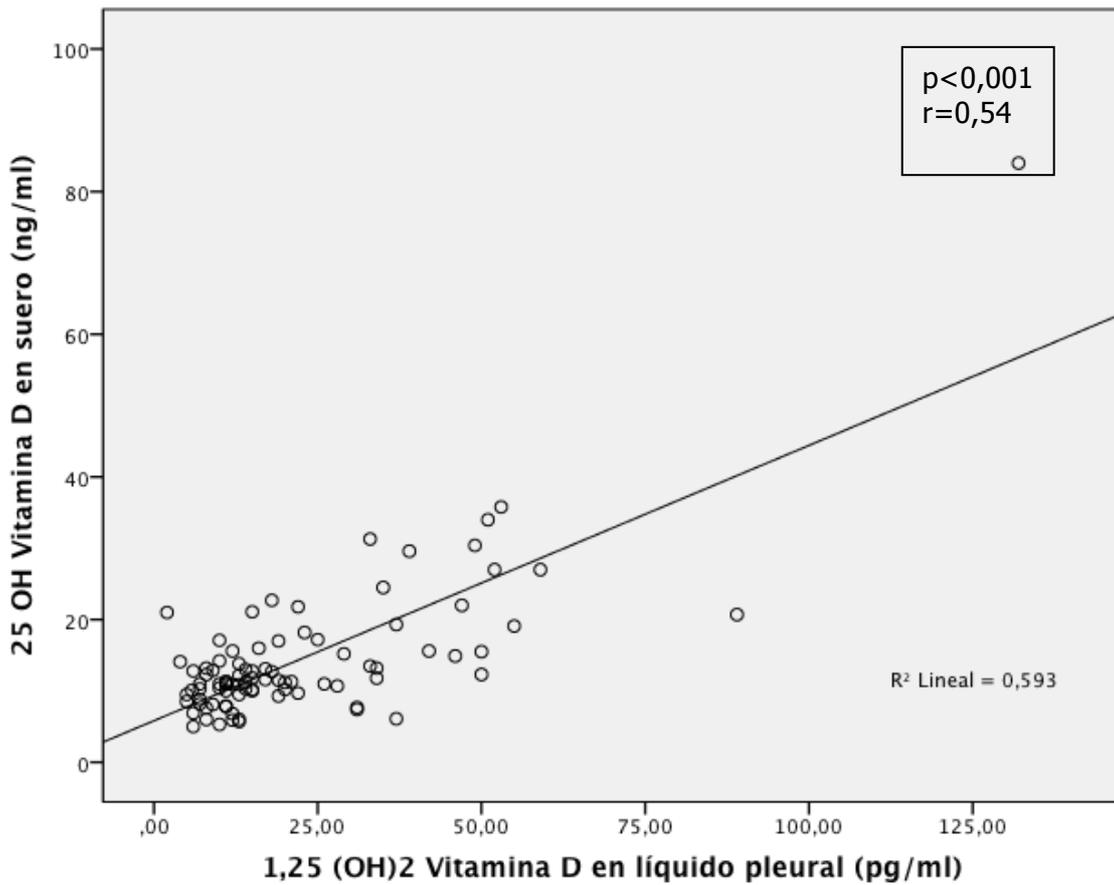
Los niveles de VDBP en suero correlacionan con sus niveles en líquido pleural ( $r=0,82$ ,  $p < 0,001$ ), con los niveles de calcio en suero ( $r=0,30$ ,  $p=0,01$ ), y con los niveles de albúmina en suero ( $r=0,31$ ,  $p=0,021$ ).

Los niveles de VDBP en líquido pleural también correlacionan con los niveles de calcio ( $r=0,30$ ,  $p=0,013$ ) y albúmina ( $r=0,26$ ,  $p=0,006$ ) en suero.

Los niveles de catelicidina en suero correlacionan solamente con sus niveles en líquido pleural ( $r=0,78$ ,  $p < 0,001$ ). No se observa correlación con los niveles de 25OH vitamina D, 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D o  $\beta$ -2-defensina.

Los niveles de  $\beta$ -2-defensina en suero correlacionan solamente con sus niveles en líquido pleural ( $r=0,65$ ,  $p<0,001$ ).

Figura 5.37. Correlación positiva entre los niveles de 25 OH vitamina D en suero y 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamina D en líquido pleural.



### 5.5.2 En los derrames pleurales infecciosos

Los niveles séricos de 25OH vitamina D correlacionan de forma significativa con los niveles de 25OH vitamina D en pleura ( $r_s=0,596$ ,  $p<0,001$ ) y con los niveles séricos o pleurales de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D ( $r_s=0,415$ ,  $p=0,04$  y  $r_s=0,409$ ,  $p=0,048$ , respectivamente).

Los niveles séricos de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D correlacionan con los niveles pleurales de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D ( $r_s=0,515$ ,  $p=0,008$ ) y con los niveles séricos de catelicidina ( $r_s=0,388$ ,  $p=0,05$ ), pero no con los niveles séricos de  $\beta$ -2-defensina.

Los niveles séricos de VDBP, catelicidina y  $\beta$ -2-defensina correlacionan significativamente con sus niveles en líquido pleural ( $r_s=0,870$ ,  $p<0,001$ ,  $r_s=0,707$ ,  $p<0,001$  y  $r_s=0,870$ ,  $p<0,001$ , respectivamente).

No se observa correlación entre los niveles de ninguna de las moléculas relacionadas con la vitamina D con la glucosa, pH o LDH, ni en suero ni en el líquido pleural.

## **5.6. CURVAS DE CARACTERÍSTICA OPERATIVA DEL RECEPTOR (*Receiver Operating Characteristic Curves*; Curvas COR) de los distintos parámetros relacionados con la vitamina D**

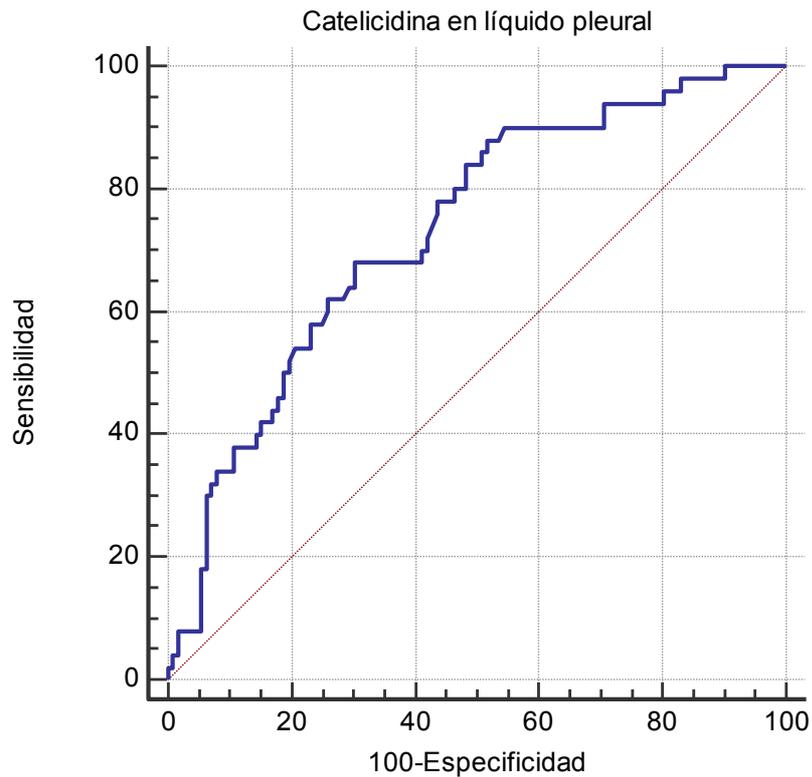
Se usaron las curvas COR para determinar la utilidad diagnóstica de los distintos parámetros relacionadas con la vitamina D que presentaban niveles estadísticamente distintos en alguno de los subgrupos anteriormente comentados. En estas curvas se refleja el espectro completo de los pares sensibilidad/especificidad para todos los valores y se determina el punto óptimo de equilibrio entre los dos parámetros. La determinación del área bajo la curva (AUC) nos ayuda a valorar la precisión diagnóstica es decir, la probabilidad de clasificar correctamente a los individuos.

### **5.6.1 UTILIDAD PARA DIFERENCIAR LOS DISTINTOS GRUPOS ETIOLÓGICOS**

En el caso de los grupos etiológicos, se valoraron las áreas bajo la curva de todos los parámetros que presentaron diferencias estadísticamente

significativas en sus niveles al ser comparados con otros grupos etiológicos. A continuación se presentan las curvas COR de los parámetros con potencial utilidad diagnóstica (Figuras 5.38-5.39).

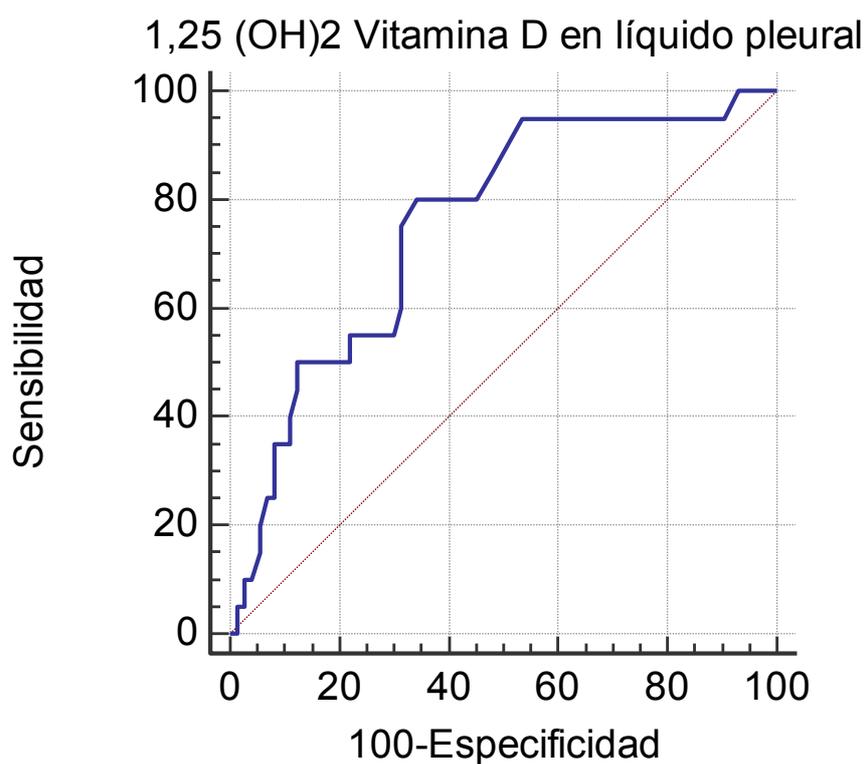
Figura 5.38. Curva COR para Catelicidina en líquido pleural como diagnóstico de derrames pleurales de etiología infecciosa.



Área bajo la curva	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	P
0,732	0,0419	0,657-0,798	<0,0001

Valor óptimo	Sensibilidad	Especificidad
3,39	31	93

Figura 5.39. Curva COR para 1,25 (OH)<sub>2</sub> Vitamina D en líquido pleural como diagnóstico de derrames pleurales de etiología tumoral.

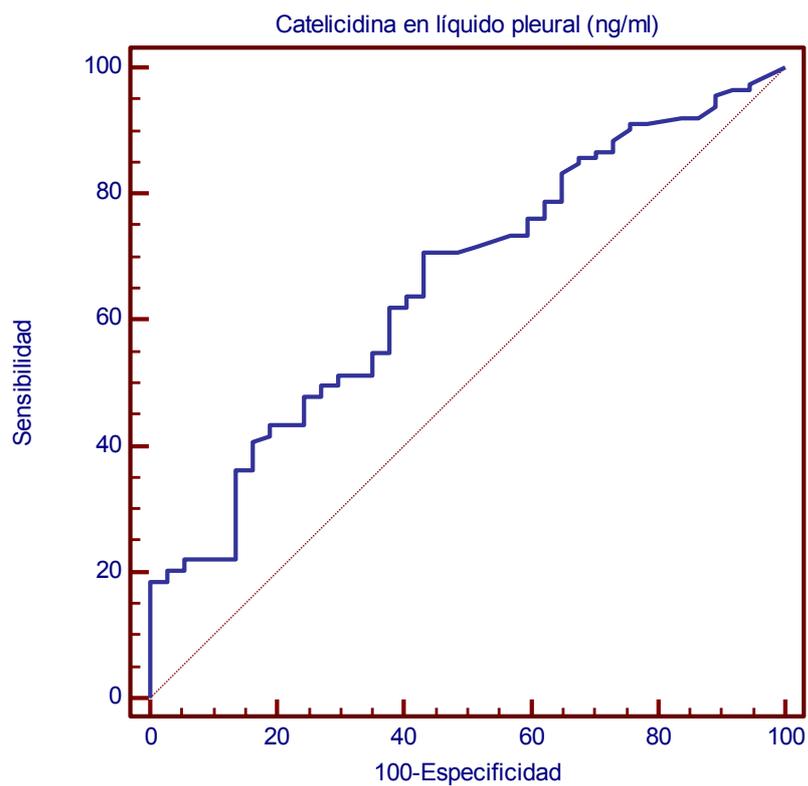


Área bajo la curva	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	P
0,754	0,0596	0,654-0,838	<0,0001

Valor óptimo	Sensibilidad	Especificidad
>17	80	65

### 5.6.2 Utilidad para diferenciar exudados y trasudados (Figuras 5.40-5.44)

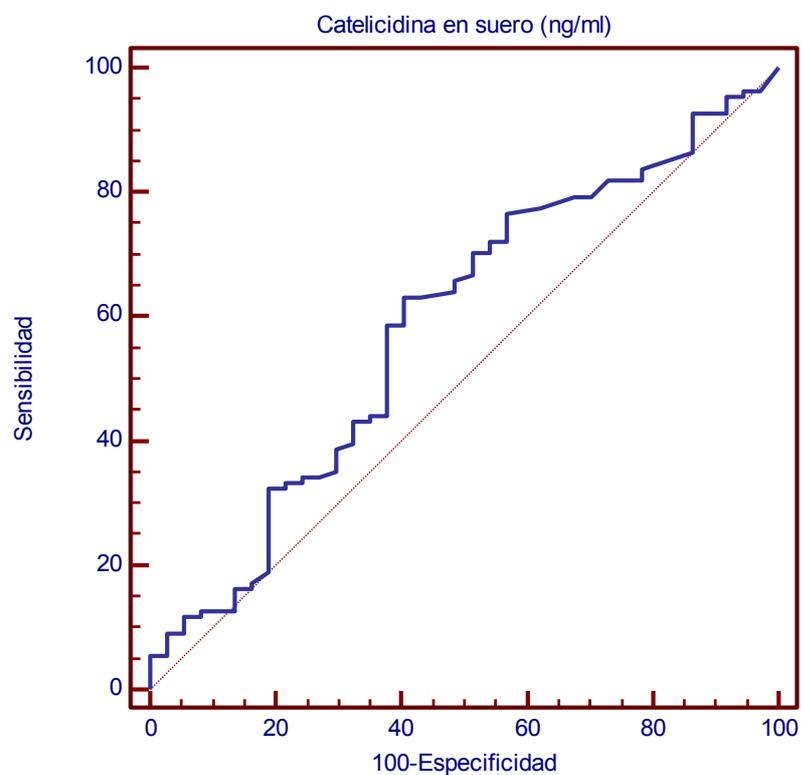
Figura 5.40. Curva COR para catelicidina en líquido pleural y clasificación en exudados.



Área bajo la curva	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	P
0,657	0,0499	0,575-0,733	0,0016

Valor óptimo	Sensibilidad	Especificidad
>0,01	100	0,00

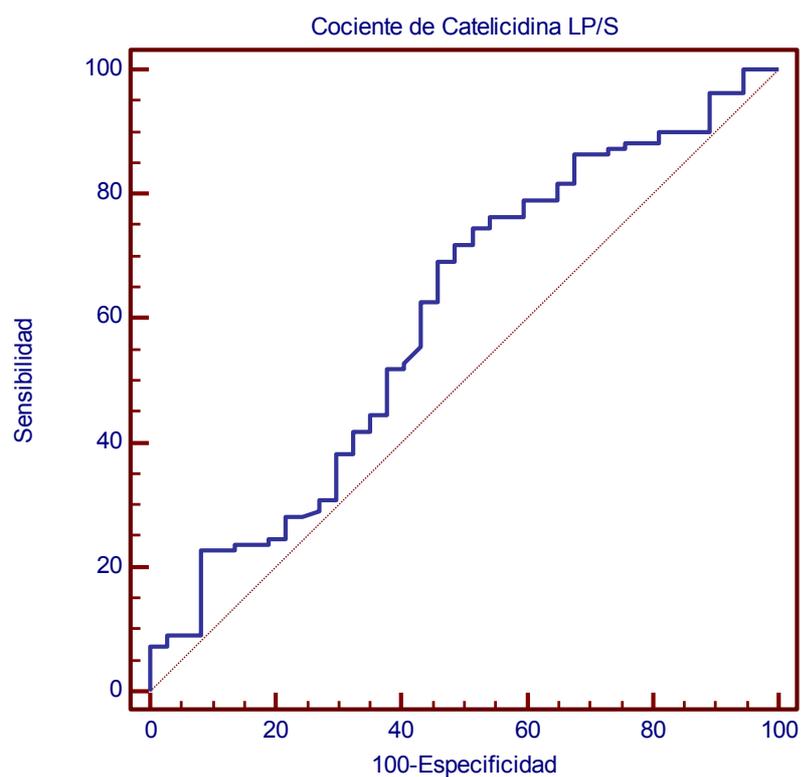
Figura 5.41. Curva COR para catelicidina en suero y clasificación en exudados.



Área bajo la curva	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	P
0,586	0,0553	0,503-0,667	0,1181

Valor óptimo	Sensibilidad	Especificidad
>0,01	100	0,00

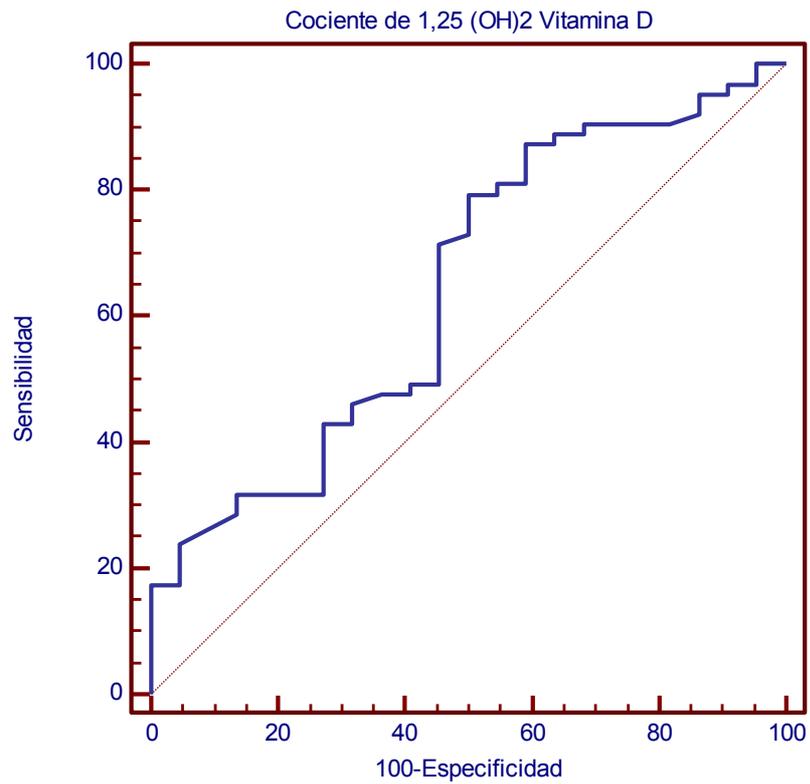
Figura 5.42. Curva COR para catelicidina en líquido pleural / suero y clasificación en exudados.



Área bajo la curva	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	P
0,603	0,056	0,519-0,683	0,0658

Valor óptimo	Sensibilidad	Especificidad
>0,1111	100	5,41

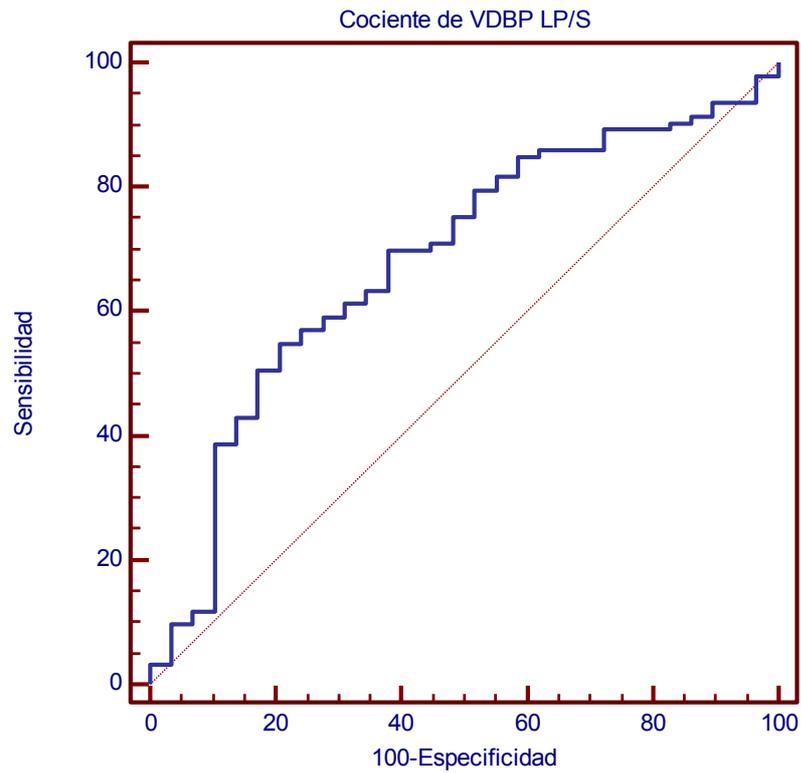
Figura 5.43. Curva COR para cociente de 1,25 (OH)<sup>2</sup> vitamina D en líquido pleural / Suero y clasificación en exudados.



Área bajo la curva	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	P
0,643	0,0702	0,532-0,744	0,0413

Valor óptimo	Sensibilidad	Especificidad
>0,0417	100	4,55

Figura 5.44. Curva COR para cociente de VDBP en líquido pleural / Suero y clasificación en exudados.



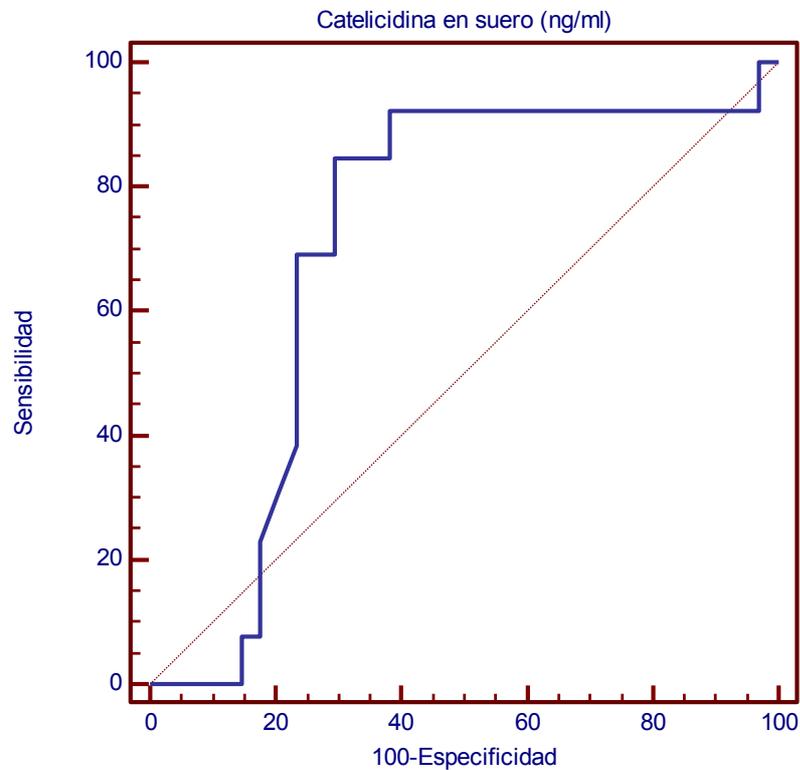
Área bajo la curva	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	P
0,682	0,0569	0,591-0,763	0,0014

Valor óptimo	Sensibilidad	Especificidad
>0,0315	100	0

### 5.6.3 UTILIDAD PARA DIFERENCIAR DERRAMES COMPLICADOS Y NO COMPLICADOS

Para valorar la utilidad de los parámetros para diferenciar entre un derrame pleural infeccioso complicado y no complicado, utilizamos las mismas técnicas estadísticas.

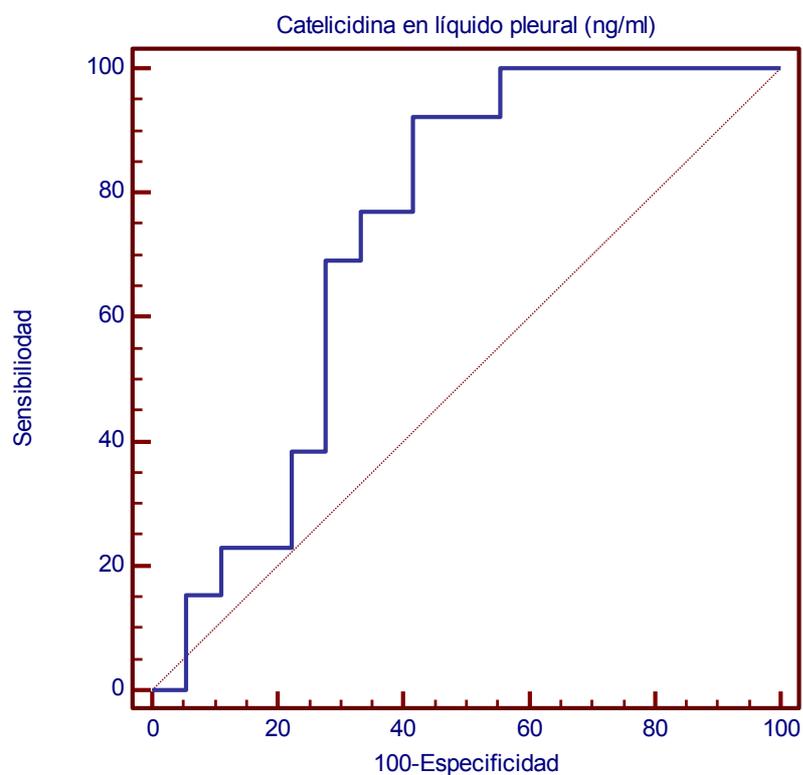
Figura 5.45. Curva COR para catelicidina en suero y clasificación en derrames complicados.



Área bajo la curva	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	P
0,708	0,0856	0,557-0,831	0,0015

Valor óptimo	Sensibilidad	Especificidad
>0,9	84	70

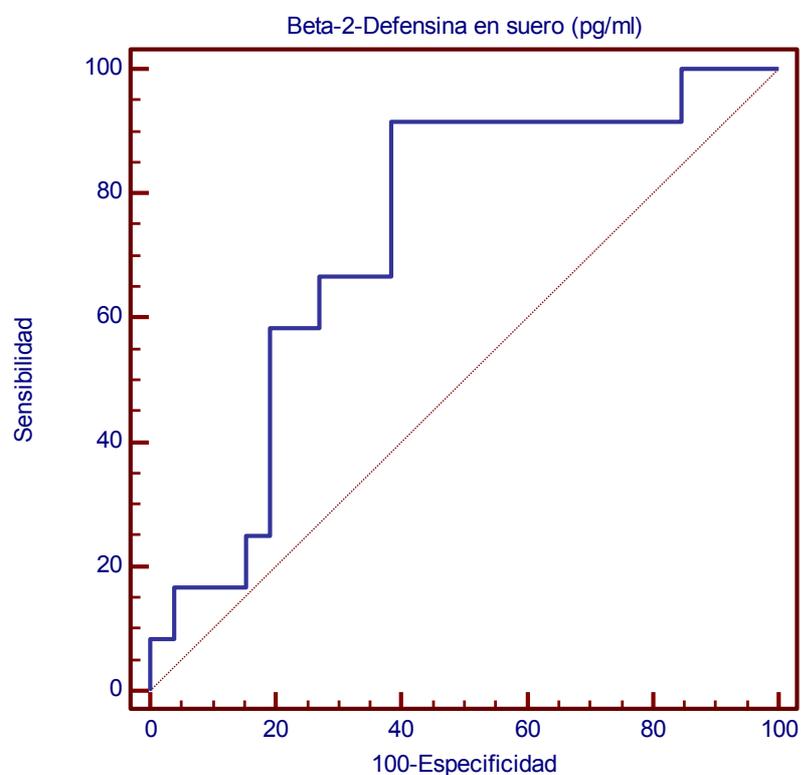
Figura 5.46. Curva COR para catelicidina en líquido pleural y clasificación en derrames complicados.



Área bajo la curva	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	P
0,731	0,0710	0,585-0,847	0,0012

Valor óptimo	Sensibilidad	Especificidad
>153	0	100

Figura 5.47. Curva COR para  $\beta$ -2-defensina en suero y clasificación en derrames complicados.



Área bajo la curva	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	P
0,731	0,0877	0,562-0,861	0,0085

Valor óptimo	Sensibilidad	Especificidad
<114	58	80

## **6. DISCUSIÓN**

## **Hipovitaminosis D en los derrames pleurales**

Thomas *et al* (1998) comprobaron que la prevalencia de hipovitaminosis D era muy alta en una población no seleccionada de pacientes ingresados en el área médica del Massachusetts General Hospital de Boston. De un total de 290 pacientes estudiados los niveles de 25OH vitamina D eran de  $15 \pm 9$  ng/ml; de ellos 164 (57%) tenían hipovitaminosis D, definida entonces como niveles de 25OH vitamina D  $< 15$  ng/ml, y 65 presentaban hipovitaminosis severa (definida como niveles  $< 8$  ng/ml), (22% del total). Un estudio multivariante comprobó numerosos factores que parecían asociarse a la hipovitaminosis D en este tipo de pacientes: la edad avanzada, la ingesta insuficiente de vitamina D y/o calcio, la insuficiente irradiación solar, determinadas enfermedades crónicas (síndrome nefrótico, malabsorción, cirrosis hepática, obesidad mórbida, etc) y el uso de fármacos que alteraban la 25 hidroxilación de la vitamina D o que aumentaban su catabolismo (difenilhidantoína, carbamacepina, rifampicina, corticoides), aunque un significativo número de casos no se explicaba por estos mecanismos. Desde entonces se ha detectado la presencia de hipovitaminosis D en numerosos tipos de pacientes, hospitalizados o no, del área médica, quirúrgica o de cuidados intensivos y con múltiples enfermedades, sin que en muchos casos se expliquen los factores implicados.

Bouillon *et al* en una revisión muy reciente recuerdan que la determinación de los niveles séricos de 25OH vitamina D sigue siendo problemática, ya que muchos métodos automatizados pueden diferir en un 20% por arriba o por abajo de los valores obtenidos con el método patrón (Bouillon *et al* 2013). Por esta razón todos los ensayos deberían calibrarse frente a estándares internacionales como el "Vitamin D External Quality Assessment Scheme" o DEQAS ([www://http.deqas.org](http://www.deqas.org)) (Hollis 2010). Nuestro laboratorio está acreditado por dicha asociación (*Certificate of Proficiency DEQAS*), que compara anualmente el valor real de las determinaciones en

función de los resultados obtenidos en 5 muestras cuatrimestrales distintas de suero humano no procesado comparando los resultados de 1200 laboratorios distribuidos por 56 países contrastándolos con el valor de referencia del NIST (*National Institute of Standards and Technology*) obtenido mediante cromatografía líquida de dilución isotópica combinada en tándem con espectrometría de masas. Por todo ello consideramos que nuestras determinaciones de 25OH vitamina D son muy fiables.

En nuestra serie completa la prevalencia de hipovitaminosis D es muy alta (casi un 70% de los pacientes tienen cifras de 25OH vitamina D <20 ng/ml) y el 28% tienen hipovitaminosis severa (<10 ng/ml). No existen datos en la literatura para comparar con otras series de enfermos con derrame pleural, ya que no hemos encontrado ningún estudio similar en este tipo de pacientes. Sin embargo nuestros pacientes tenían una edad algo superior a los pacientes ingresados en planta de medicina interna del estudio de Thomas *et al*, y coincidían con ellos en tener una ingesta pobre de vitamina D y/o calcio, insuficiente radiación solar y enfermedades agudas o crónicas graves, aunque el uso de fármacos que pudieran modificar potencialmente los niveles de 25OH vitamina D era muy bajo (Thomas *et al* 1998). En nuestro mismo Hospital un estudio en 45 pacientes ingresados en el Servicio de Medicina Interna mostró una prevalencia de hipovitaminosis D algo más alta que la nuestra, aunque el perfil de enfermos era distinto en edad y comorbilidades, y la técnica usada para medir 25OH vitamina D era asimismo diferente (Neila Calvo *et al* 2013).

A título ilustrativo, y en relación con las enfermedades pulmonares, podemos reseñar los muy recientes datos de Kunisaki *et al* (Kunisaki *et al* 2012) obtenidos en una serie de 973 pacientes con EPOC severo sin exacerbaciones recientes (70% GOLD III/IV, edad  $64,5 \pm 8,6$  años) representativos de un nutrido grupo de centros de EE UU, que encuentran hipovitaminosis D en el 32% de los pacientes, siendo esta severa en el 8,4%. Otro hecho interesante de este estudio es la baja estacionalidad de los niveles de 25OH vitamina D (sólo hay diferencia estadísticamente significativa entre verano e invierno y es de 4,1 ng/ml). De todas maneras debe tenerse en cuenta que en EE UU, como

en los países escandinavos, se suplementan diversos alimentos con vitamina D y en conjunto es el área del mundo con niveles más altos de 25OH vitamina D en la población (Hilger *et al* 2013). Otro trabajo danés publicado en 2013 encontró una prevalencia de hipovitaminosis D del 45% en un grupo de 462 pacientes con EPOC severo estable (Holmgaard *et al* 2013). En estos pacientes no se observó variación estacional de los niveles de 25OH vitamina D, que los autores atribuyeron al mal estado clínico que conllevaba poca irradiación solar. De todas maneras estas cifras son mucho mejores que las que se encontraron en una cohorte prospectiva de 356 pacientes suizos y holandeses con EPOC estadios II-IV en los que los niveles basales fueron de  $15,5 \pm 8,9$  ng/ml, de manera que el 77% de los pacientes tenían hipovitaminosis D, una cifra muy similar, algo mayor, que la que encontramos en nuestro grupo de pacientes (Puhan *et al* 2013).

En un estudio preliminar habíamos comparado los niveles de 25OH vitamina D de un grupo de 37 pacientes con derrame pleural (en su mayor parte de causa infecciosa) frente a un grupo control emparejado por edad y periodo del año y habíamos comprobado que las diferencias eran claras, controlando el efecto de la estacionalidad.

Con el fin de valorar si el estado nutricional en vitamina D es diferente según la causa del derrame estudiamos tres grupos de pacientes bien caracterizados (los DPC, los DPI y los DPT), excluyendo los casos tipificados como miscelánea, por su baja representatividad. La hipovitaminosis D es más frecuente y grave en los pacientes con DPC, posiblemente porque la insuficiencia cardíaca en esta fase tan avanzada limita gravemente la exposición al sol en estos pacientes. Quizás también se asocie una menor ingesta oral de vitamina D, y, por otro lado, es el grupo con más edad, aunque el impacto real de la edad no parece importante en estos pacientes, a diferencia de lo que encontramos en sujetos sanos en un estudio previo (Alvarez Rodriguez *et al* 2012) en los que el rango de edades (20-80 años) era mucho mayor (aquí sólo se diferencian en una década). Los pacientes con DPT son los menos afectados (aunque también tienen hipovitaminosis). Los derrames infecciosos quedan en

el medio. Los resultados en el líquido pleural van paralelos a lo que ocurre en sangre y, de hecho, el cociente de 25OH vitamina D en LP/S es igual en todos ellos, lo que indica que la 25OH vitamina D cruza libremente la membrana pleural en todas las causas estudiadas.

Al estudiar el grado de hipovitaminosis D y los niveles de 25OH vitamina D en los pacientes con derrame pleural infeccioso no encontramos diferencias entre los que presentaban un derrame complicado o no complicado, lo cual sugiere que ambos factores no están relacionados, ni en el sentido de que la hipovitaminosis más grave condicione una peor evolución, ni en el sentido de que la peor evolución genere un mayor descenso de los niveles de 25OH vitamina D.

Nuestros datos sugieren la existencia de un factor de estacionalidad en los niveles de 25OH vitamina D en los DP, con diferencias entre las cifras de los meses sin sol comparados con los meses soleados, pero, para poder precisar esto sería necesaria una muestra 5-8 veces superior a la que tenemos (al menos 50-80 pacientes en cada subgrupo). En cualquier caso el objetivo de este estudio no pretendía valorar la estacionalidad, sino la existencia o no de hipovitaminosis y su repercusión en los antibióticos vitamina D dependientes.

Finalmente, debido al fuerte impacto de los pacientes con enfermedad cardiaca sobre el grupo de DP tipo trasudado los resultados demuestran una mayor edad, unos niveles más bajos de 25OH vitamina D y una prevalencia mucho mayor de hipovitaminosis grave en este grupo.

### **Metabolitos de la vitamina D y VDBP en suero y líquido pleural en los pacientes con derrame pleural**

Con respecto a la 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D nuevamente se detectan las cifras más bajas en suero en los DPC y las más altas en los DPT, con los DPI ocupando un lugar intermedio. En el líquido pleural los resultados son similares, siendo las concentraciones de los DPC inferiores a los DPT. Sin embargo, el

cociente de la concentración de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D en líquido pleural dividido entre la concentración en sangre es menor en el DPC que en el DPI. Este dato podría indicar un menor paso de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D de la sangre al líquido pleural en los DPC, cosa improbable, teniendo en cuenta que el paso de 25OH vitamina D no es diferente. Otra posibilidad es que se produzca 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D en la cavidad pleural infectada, pero de todas maneras el cociente no es superior a 1, lo cual indica que esta producción, si existe, no es muy grande o se alcanza rápidamente un equilibrio entre el líquido pleural y la sangre. Nuestros pacientes con DPI tenían tuberculosis en un pequeño porcentaje, de manera que nuestros resultados no son comparables a los del estudio de Barnes *et al* (1989), que además presenta otras diferencias metodológicas importantes con el nuestro (n muy baja, técnica menos sensible y específica que la nuestra, etc). No hemos podido analizar la posible relación entre los niveles de 25OH y 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D y los gérmenes causales, debido a que sería necesario plantear un estudio multicéntrico de larga duración, como el recientemente publicado por un grupo europeo (Pletz *et al* 2014) en la neumonía comunitaria. Este estudio concluyó que no había diferencias en los metabolitos de la vitamina D entre las neumonías producidas por diferentes agentes patógenos (virus A y B de la gripe, *Legionella*, *Streptococcus pneumoniae*).

Con respecto a la VDBP no hay diferencias en suero entre los tres grupos ni entre ellos y el grupo control, lo cual excluye razonablemente una relación entre la VDBP sérica y el derrame pleural, sea de la causa que sea. En líquido pleural se encuentran cifras más altas en el DPT que en el DPC. Se puede especular con la idea de que exista un paso selectivo de MAF hacia las áreas tumorales, para producir su efecto antitumoral, y que estos fragmentos de VDBP sean medidos por nuestro ensayo. El único trabajo que mide la VDBP en suero y líquido pleural es el de Hamashima (Hamashima *et al* 2002), pero se centra en comparar exudados con trasudados, por lo que lo comentaremos en este punto.

Tampoco encontramos diferencias significativas en los niveles séricos de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D o VDBP entre los DPI complicados o no complicados. Estos datos sugieren que los metabolitos de vitamina D no parecen marcar diferencias entre ambos tipos de derrame, y que el hecho de que este se complique o no depende de otros factores, probablemente locales. Nuevamente no hay datos en la literatura con los que comparar nuestros resultados. Nguyen *et al* (2013) han comprobado recientemente que los niveles séricos bajos de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D en los pacientes con sepsis grave tienen valor pronóstico negativo y lo atribuyen a una insuficiente respuesta de la 1 $\alpha$ -hidroxilasa renal al efecto de la PTH, aunque la evidencia que presentan en su trabajo es fundamentalmente de asociación, no necesariamente causal. Curiosamente el muy reciente estudio de Pletz *et al* (2014) vuelve a incidir en la importancia de la 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D sérica en el contexto de la gravedad de la neumonía comunitaria, ya que también existe una correlación negativa entre ambas (controlando por edad, estación y germen), que, sin embargo, no existe con la 25OH vitamina D sérica. Estos datos, sumados a otros de la literatura (Autier *et al* 2014) plantean la idea de que, al menos en la patología infecciosa, debe prestársele más interés a los niveles de calcitriol e incluso hacer ensayos clínicos utilizando como fármaco el metabolito activo de la vitamina D, no su precursor inactivo.

Habíamos hipotetizado que los niveles pleurales de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D podrían estar aumentados en los pacientes con DPI complicado, pero nuestros datos no apoyan esta hipótesis. Hay varias posibles explicaciones para ello. Por una parte, podría ser que los bajos niveles de la molécula precursora 25OH vitamina D limitasen la producción de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D, pero esto parece improbable, teniendo en cuenta la enorme diferencia de moles de 25OH vitamina D respecto a los de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D (del orden de 1000 veces). Por otro lado, la producción intracrina de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D a nivel pleural puede no ser suficiente para inducir cambios medibles a nivel pleural o sérico (especialmente a nivel sérico donde el nivel de dilución sería muy elevado). Desde el punto de vista de la clínica esto también coincide con la baja frecuencia de hipercalcemia inducida por las infecciones (excepto algunos casos

de tuberculosis y otras enfermedades granulomatosas fúngicas, cuya representación en nuestros DPI era muy baja). De todas maneras la hipovitaminosis D puede prevenir la aparición de hipercalcemia en este contexto, ya que la administración de vitamina D aumenta el riesgo de hipercalcemia en estos enfermos (Lavender *et al* 2012).

La correlación positiva entre los niveles séricos de 25OH vitamina D y 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D que se aprecia en el presente estudio, es algo típico del déficit de vitamina D e indica que el factor limitante para la producción de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D son los niveles de 25OH vitamina D. Si los niveles de 25OH vitamina D fuesen normales, en condiciones fisiológicas normalmente este tipo de correlación no tendría que encontrarse, ya que el ajuste se haría a través de la PTH. En este sentido los datos muy recientes de Pletz *et al* (2014) en pacientes con neumonía comunitaria son idénticos a los nuestros.

En el caso de los trasudados vs exudados los niveles de 25OH vitamina D en líquido pleural son inferiores en los trasudados, como sería de esperar. Además esta molécula parece pasar libremente a través de la membrana pleural, si tenemos en cuenta que los cocientes de LP/S son iguales en exudados y trasudados. Los niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D en suero no son diferentes entre exudado y trasudado, lo cual sugiere que el mecanismo de retroalimentación mediado por la PTH elevada permite mantener niveles similares en ambos grupos, aunque una limitación de este estudio es que no medimos los niveles de PTH. Alternativamente se podría producir 1,25(OH)<sub>2</sub> a nivel pleural en los exudados, que pasaría a la sangre. En este sentido los niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D son más altos en el LP de los exudados que en los trasudados, lo cual apoyaría esta segunda hipótesis.

Los niveles de VDBP en suero y LP no resultaron ser diferentes entre los exudados y los trasudados, pero el índice LP/S fue mayor en los exudados. En el único estudio disponible similar al nuestro (Hamashita *et al* 2002) los niveles de VDBP en suero tampoco eran diferentes, mientras que en LP los niveles eran inferiores y el índice LP/S era, como en nuestro caso, superior en los exudados. Por lo tanto nuestros datos corroboran en su mayor parte los datos de este

trabajo previo, aunque existen diferencias sustanciales entre ambos estudios. En primer lugar nuestros pacientes eran caucásicos y los de Hamashita *et al* japoneses. Es bien conocida la gran heterogeneidad de los niveles y las características funcionales de la VDBP entre razas, e incluso dentro de cada raza, debido al polimorfismo tan marcado de esta proteína, especialmente en los blancos. En segundo lugar nuestra muestra es muy superior a la de ellos, lo cual da más seguridad estadística a los resultados, teniendo en cuenta esta heterogeneidad. En tercer lugar el método de cuantificación es diferente (ELISA vs inmunturbidimetría), siendo nuestro método, con sus limitaciones, el mejor de los actuales (Powe *et al* 2013).

### **Péptidos antibióticos vitamina D dependientes en sangre y líquido pleural en los pacientes con derrame pleural**

La existencia de "actividad antibacteriana" en el líquido pleural humano infectado se conoce desde hace años (Miglioli *et al* 1998, Ashitani *et al* 1998) y se han demostrado numerosos factores con esta actividad (anticuerpos, complemento, lisozima,  $\alpha$ -defensina y diversas enzimas). Nuestros datos demuestran que la catelicidina también debe incluirse en esta lista.

La catelicidina en suero y en líquido pleural, y el cociente catelicidina en LP/S están claramente elevados en los DPI comparados con los DPC o DPT. Estos datos sugieren secreción activa de catelicidina en el área peripleural con acúmulo en el LP y paso a la sangre. Esta secreción ocurre incluso en presencia de hipovitaminosis D, lo que indica que se puede producir una respuesta de este péptido incluso en situación de hipovitaminosis en los pacientes con infección, posiblemente por activación de otros mecanismos (citoquinas inflamatorias tipo Il-1, estrés del sistema endoplásmico, etc.). En este sentido resulta muy interesante el hecho de que exista una correlación positiva entre los niveles séricos de catelicidina y de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D, pero no con los de 25OH vitamina D en los DPI, correlación que, sin embargo, no se observa en el grupo total de DP. Este hecho indicaría que el calcitriol circulante podría jugar un papel mas importante que la propia 25OH vitamina D en el contexto

de la infección asociada a hipovitaminosis D, como sugieren otros trabajos (Nguyen *et al* 2013, Moller *et al* 2007, Pretzl *et al* 2014), en los que se plantea como hipótesis interesante que quizás se debería de administrar calcitriol en los ensayos clínicos que intenten valorar la utilidad de la vitamina D en las enfermedades infecciosas, cosa que hasta ahora no se ha evaluado. Finalmente resulta importante identificar los gérmenes más sensibles a la catelicidina, ya que esta o alguno de sus análogos pueden convertirse en un arma muy eficaz contra los gérmenes resistentes a la terapia antibiótica habitual.

Contrariamente a la catelicidina, los niveles de  $\beta$ -2-defensina en LP y suero son similares en todos los tipos de derrame, lo que indica, que o bien es muy dependiente de niveles adecuados de 25OH vitamina D o que su secreción está regulada de manera distinta. De todas maneras se ha comprobado que la secreción de este antibiótico en respuesta al calcitriol *in vitro* es menor que la de catelicidina (Liu *et al* 2006). También podría ser posible que el perfil temporal de respuesta de la  $\beta$ -2-defensina fuese diferente al de la catelicidina, o que realmente no esté implicada en la defensa de las infecciones pleurales, de modo diferente a lo que ocurre en el modelo murino (Hussain *et al* 2008). Tampoco podemos excluir la posibilidad de que nuestro ensayo no detecte todos los posibles fragmentos activos de  $\beta$ -2-defensina, pero parece una explicación muy rebuscada.

Cuando comparamos los niveles de catelicidina en DPI complicados frente a no complicados nos encontramos con una exacerbación del patrón antes señalado, de manera que los DPI complicados presentan niveles más altos de catelicidina en sangre y LP y más bajos de  $\beta$ -2-defensina, lo que añade credibilidad biológica a los hallazgos. El significado de esta disociación entre ambos péptidos y la posible utilidad práctica de este hallazgo debe investigarse con un número de pacientes mayor. Incidiendo en este aspecto, se ha comprobado que la  $\beta$ -2-defensina disminuye en sangre en la sepsis (Olbrich *et al* 2013) y por otro lado los niveles bajos de esta citoquina son un predictor independiente de resultados adversos en la evolución de la neumonía comunitaria (Liu *et al* 2013).

No hemos observado ninguna diferencia en los niveles de catelicidina en LP o suero o en el cociente de catelicidina LP/S entre los DPC o DPT, lo que indicaría que estos péptidos no ejercen ninguna función en este contexto, aunque no se puede excluir que puedan estar implicados en algunos tumores concretos, ya que se ha comprobado que la catelicidina puede tener tanto efectos facilitadores del crecimiento de algunos tumores, mientras que inhiben otros (Vandamme *et al* 2012).

Debido al notable peso de las infecciones en los exudados y de la insuficiencia cardiaca en los trasudados observamos mayores niveles de catelicidina en sangre y LP, y del cociente de catelicidina LP/S en los exudados comparados con los trasudados, sin apreciarse diferencias en los parámetros de  $\beta$ -2-defensina.

### **Utilidad diagnóstica de las moléculas vitamina D dependientes**

La utilidad diagnóstica de las distintas moléculas analizadas se valoró mediante las curvas ROC.

### **Utilidad para diferenciación etiológica**

Sólo dos de las técnicas utilizadas para diferenciar la etiología de los derrames pleurales mostraron un AUC próxima a 0,750, por lo que se considera que las moléculas analizadas tienen una utilidad limitada. Si comparamos con otras moléculas utilizadas para diagnóstico etiológico de los derrames pleurales, como el pro-BNP, o el TNF- $\alpha$ , utilizados para los derrames pleurales de etiología cardiaca e infecciosa respectivamente, su AUC resulta muy inferior (Porcel *et al* 2009). Dada la utilidad limitada de estas moléculas y su coste, consideramos que no tienen utilidad en la práctica clínica.

### **Utilidad para diferenciación entre exudados y trasudados**

Los métodos de Light (Light *et al* 1972) con su sensibilidad de 97,9% [95% IC 96,9 a 98,9%]; y especificidad de 74,3% [95% IC 68,9 a 79,7%]

continúan siendo el método de referencia para diferenciar entre exudados y trasudados. Ninguna de las técnicas analizadas en el apartado de resultados del presente estudio presentan un área bajo la curva por encima de 0,65, por lo que consideramos que las moléculas valoradas tienen una utilidad regular o mala, y que, por lo tanto no pueden competir con técnicas tan establecidas y validadas como los criterios de Light.

### **Utilidad para diferenciación entre derrames complicados y no complicados**

Las determinaciones de glucosa y pH en el líquido pleural son recomendadas por el American College of Chest Physicians y Light a la hora de tomar la determinación de colocar un tubo de tórax en un derrame pleural complicado para asegurar su resolución. De nuevo, ninguna de las pruebas utilizadas para diferenciar entre derrames complicados y no complicados encontraron un AUC por encima del 0,75 por lo que consideramos que los parámetros estudiados tienen una utilidad limitada y se encuentran sobrepasados de forma significativa por los test utilizados en la práctica clínica habitual (pH y glucosa en líquido pleural), que en algunas series (Marchi *et al* 2012) alcanzan un AUC de 1 con la glucosa.

## Limitaciones del estudio

Se trata de un estudio transversal, con muestras recogidas a lo largo de 2 años. Para caracterizar mejor los resultados se podría hacer un estudio evolutivo, pero en cualquier caso, aquí interferiría el tratamiento, una vez establecido el diagnóstico.

Los DPT son debidos a diferentes tumores primarios, que pueden tener un comportamiento biológico diferente. Así mismo los DPI incluyen diferentes gérmenes causales, que también pueden producir respuestas biológicas diferentes, pero hacer subgrupos, de acuerdo con el germen causal (por ej sería ideal el *M. tuberculosis*), necesitaría un periodo mucho más dilatado en el tiempo para obtener muestras suficientes en nuestro medio o realizar un estudio multicéntrico.

El número de pacientes estudiados es suficiente para hacer estudios fisiopatológicos exploratorios, pero no para valorar supervivencia ni otros parámetros de interés clínico inmediato.

No se determinó PTH, lo cual mejoraría la interpretación de las respuestas de los metabolitos de vitamina D, pero no influiría en los de los péptidos antibióticos. No se valoró 25OH D "libre" o "bioactiva", aunque existen muchas dudas sobre la utilidad de esta cuantificación (Powe *et al* 2013, Chun *et al* 2014). No se valoró el efecto de los polimorfismos de la CYP27B, de la VDBP o del receptor de la vitamina D en los resultados. Nuevamente para poder acometer esta empresa hacen falta estudios multicéntricos con un número muy superior de pacientes.

## **7. CONCLUSIONES**

1. Los niveles séricos de 25OH Vitamina D de los pacientes con DP son inferiores a los de un grupo control sano emparejado por edad, zona geográfica y época del año. Sin embargo los niveles séricos de VDBP no son diferentes.
2. La hipovitaminosis D es más frecuente y grave en los DPC y menos frecuente en los DPT, quedando los DPI en un nivel intermedio. Los pacientes con DP tipo trasudado tienen niveles más bajos de 25OH vitamina D en sangre y mayor prevalencia de hipovitaminosis grave que los pacientes con DP tipo exudado. No se encontraron diferencias entre los DPI complicados y no.
3. Los metabolitos relacionados con la vitamina D y los péptidos antibióticos vitamina D dependientes son medibles en líquido pleural.
4. Los niveles intrapleurales de 25OH vitamina D se comportan de forma similar a sus niveles en suero, por lo que no hay diferencias en el cociente LP/S en ningún grupo. Los niveles intrapleurales de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D son más elevados en los DPT y en los DPI que en los DPC. El cociente LP/S de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D es mayor en los DPI que en los DPC. Los DP tipo exudado tienen mayores niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D en LP que los pacientes con DP tipo trasudado, pero el calcitriol no difiere en suero. El cociente LP/S de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D es más alto en los exudados. No hay diferencias en estos parámetros entre los DPI complicados y no.

5. La catelicidina en suero o LP y el cociente de catelicidina LP/S están aumentados en los pacientes con DPI comparados con las otras causas de DP y en los exudados comparados con los trasudados. La catelicidina en suero y LP se encuentra mas elevada en los DPI complicados. No se encontraron diferencias en los niveles de  $\beta$ -2-defensina en los distintos grupos etiológicos ni en los exudados y trasudados, sin embargo, se encontraron niveles séricos mas bajos en el grupo de los DPI complicados.
6. En los pacientes con DP los niveles de 25OH vitamina D en suero correlacionan positivamente con sus niveles en LP y con los de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D en suero y LP, pero no con los de catelicidina o  $\beta$ -2-defensina. En los pacientes con DPI los niveles séricos de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D correlacionan positivamente con sus niveles pleurales y con los niveles séricos de catelicidina, pero no con los niveles séricos de  $\beta$ -2-defensina. La catelicidina sérica no correlaciona con la 25OH vitamina D sérica o intrapleural.
7. La potencial utilidad diagnóstica de los metabolitos relacionados con la vitamina D y de los antibióticos vitamina D dependientes valorada mediante curvas ROC es pobre en todos los grupos estudiados.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Yamazaki T, Yoshiki S, Suda T. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by  $1\alpha,25$  dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:4900-4994

Abe E, Miyaura C, Tanaka H, Shiina Y, Kuribayashi T, Suda S, Nishii Y, DeLuca HF, Suda T.  $1\alpha, 25$  dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> promotes fusion of mouse alveolar macrophages both by a direct mechanism and by a spleen cell-mediated indirect mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:5583-5587

Adams JS, Modlin RL, Diz MM, Barnes PF. Potentiation of the macrophage 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylation reaction by human tuberculous pleural effusion fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69:457-460.

Adams JS, Ren S, Liu PT, Chun RF, Lagishetty V, Gombart AF, Borregaard N, Modlin RL, Hewison M. Vitamin D-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. *J Immunol* 2009;182:4289-4295

Adams JS, Hewison M. Update in vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:471-478

Afzal S, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Low plasma 25-hydroxyvitamin D and risk of tobacco-related cancer. *Clin Chem* 2013;59:771-780

Afzal S, Lange P, Bojesen SE, Freiberg JJ, Nordestgaard BG. Plasma 25-hydroxyvitamin D, lung function and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2014;69:24-31

Agerberth B, Gunne H, Oderberg J, Kogner P, Boman HG, Gudmundson GH. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995;92:195-199

Agostini E, Bodega F, Zocchi L. Albumin transcytosis from the pleural space. *J Appl Physiol* 2002;93:1806-1812.

Agostini E, Tagliatetti A, Setnikar I. Absorption force of the capillaries of the visceral pleura in determination of the intrapleural pressure. *Am J Physiol* 1957;191:277-282

Akulian J, Yarmus L, Feller-Kopman D. The evaluation and clinical application of pleural physiology. *Clin Chest Med* 2013;34:11-19

Albertine KH, Wiener-Kronish JP, Staub NC. The structure of the parietal pleura and its relationship to pleural liquid dynamics in sheep. *Anat Rec* 1984;208:401-9.

Alexandrakis MG, Coulocheri SA, Bouros D. Evaluation of ferritin, Interleukin-6, Interleukin-8 and tumor necrosis- $\alpha$  in the differentiation of exudates and trasudates in pleural effusions. *Anticancer Res* 1999;19:3607-3612

Alexandrakis MG, Coulocheri SA, Bouros D, Mandalaki K, Karkavitsas N, Eliopoulos GD. Evaluation of inflammatory cytokines in malignant and benign pleural effusions. *Oncol Rep* 2000;7:1327-1332.

Allen JC, Apicella MA. Experimental pleural effusion as a manifestation of delayed hypersensitivity to tuberculin PPD. *J Immunol* 1968;101:481-487

Allen S, Gabel J, Drake R. Left atrial hypertension causes pleural effusion formation in unanesthetized sheep. *Am J Physiol* 1989;257:690-692

Alvarez-Rodriguez L, López-Hoyos M, García-Unzueta MT, Amado JA, Cacho PM, Martínez-Taboada VM. Age and low levels of circulating vitamin D are associated with impaired innate immune function. *J Leukoc Biol* 2012;91:829-838

Anderson CB, Philpott GW, Ferguson TB. The treatment of malignant pleural effusion. *Cancer* 1974;33:916-922

Anderson RL, Hiemstra PS, Ward C, Forrest LA, Murphy D, Proud D, Lordan J, Corris PA, Fisher AJ. Antimicrobial peptides in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Eur Respir J* 2008;37:670-677

Andrews NC, Parker EF, Shaw RR. Management of nontuberculous empyema. *Am Rev Respir Dis* 1962:935-936

Antman KH. Clinical presentation and natural history of benign and malignant mesothelioma. *Semin Oncol* 1981;8:313-820

Antonangelo L, Vargas FS, Almeida LP, Acencio MM, Gomes FD, Sales RK, Seicento M, Teixeira RL. Influence of storage time and temperature on pleural fluid adenosine deaminase determination. *Respirology* 2006;11:488-92

Antony VB, Godbey SW, Kunkel SL, Hott JW, Hartman DL, Burdick MD, Strieter RM. Recruitment of inflammatory cells to the pleural space. Chemotactic cytokines, Il-8 and monocyte chemotactic peptide 1 in human pleural fluids. *J Immunol* 1993;151:7216-7226

Antony VB, Sahn SA, Antony AC, Repine JE. Bacillus Calmette-Guérin-stimulated neutrophils release chemotaxins for monocytes in rabbit pleural spaces and in vitro. *J Clin Invest* 1985;76:1514-1521

Apffelstaedt JP, Van Zyl JA, Muller AG. Breast cancer complicated by pleural effusion: patient characteristics and results of surgical management. *J Surg Oncol* 1995;58:173-175

Ashitani J, Mukae H, Nakazato M, Taniguchi H, Ogawa K, Kohno S, Matsukura S. Elevated pleural fluid levels of defensins in patients with empyema. *Chest*. 1998;113:788-794

- Assi Z, Caruso JL, Herndon J, Patz EF Jr. Cytologically proved malignant pleural effusions: distribution of transudates and exudates. *Chest* 1998;113:1302-1304
- Autier P, Boniol M, Pizot C, Mullie P. Vitamin D status and ill health: a systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;2:76-89
- Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson JM. Human  $\beta$ -defensin-2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 1998;102:874-880
- Banerjee AK, Willetts I, Robertson JF, Blamey RW. Pleural effusion in breast cancer: a review of the Nottingham experience. *Eur J Surg Oncol* 1994;20:33-36
- Bang KM, Pinheiro GA, Wood JM, Syamlal G. Malignant mesothelioma mortality in the United States, 1999-2001. *Int J Occup Environ Health* 2006;12:9-15
- Barbeiro DF, Barbeiro HV, Zampieri FG, Cesar Machado MC, Torggler Filho F, Gomes Cunha DM, Goulart AC, Velasco IT, Monteiro de Cruz Neto L, Possolo de Souza H, Pinheiro da Silva F. Cathelicidin LL-37 bloodstream surveillance is down regulated during septic shock. *Microbes Infect* 2013;15:342-346
- Barbour GL, Coburn JW, Slatopolsky E, Norman AW, Horst RL. Hypercalcemia in an anephric patient with sarcoidosis: evidence for extrarenal generation of 1,25-dihydroxyvitamin D. *New Engl J Med* 1981;305:440-443
- Barnes PF, Modlin RL, Bikle DD, Adams JS. Transpleural gradient of 1,25-dihydroxyvitamin D in tuberculous pleuritis. *J Clin Invest* 1989;83:1527-1532
- Barrat FJ, Cua DJ, et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)-and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 2002;195:603-616
- Bartlett JG, Finegold SM. Anaerobic infections of the lung and pleural space. *Am Rev Respir Dis* 1974;110:56-77
- Baumann MH, Nolan R, Petrini M, Lee YC, Light RW, Schneider E. Pleural tuberculosis in the United States: incidence and drug resistance. *Chest* 2007;131:1125-32
- Berger HW, Mejia E. Tuberculous pleurisy. *Chest* 1973;63:88-92
- Bergman P, Lindh AU, Björkhem-Bergman L, Lindh JD. Vitamin D and respiratory tract infections: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One* 2013;8:e65835
- Bergman P, Norlin AC, Hansen S, Rekha RS, Agerberth B, Björkhem-Bergman L, Ekström L, Lindh JD, Andersson J. Vitamin D3 supplementation in patients with frequent respiratory tract infections. A randomized and double blind intervention study. *BMJ Open* 2012;2:e001663

Berkestedt I, Herwald H, Ljunggren L, Nelson A, Bodelsson M. Elevated plasma levels of antimicrobial polypeptides in patients with severe sepsis. *J Innate Immun* 2010;2:478-482

Berkman N, Breuer R, Kramer MR, Polliack A. Pulmonary involvement in lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1996;20:229-237

Berman DW, Crump KS. Technical support document for a protocol to assess asbestos-related risk. *EPA J* 2003;9345:1-4

Bhalla AK, Amento EP, Clemens TL, Holick MF, Krane SM. Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:1308-1310

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

Bielsa S, Esquerda A, Salud A, Montes A, Arellano E, Rodríguez-Panadero F, Porcel JM. High levels of tumor markers in pleural fluid correlate with poor survival in patients with adenocarcinomatous or squamous malignant effusions. *Eur J Intern Med* 2009;20:383-386.

Bielsa S, Panadés MJ, Egido R, Rue M, Salud A, Matías-Guiu X, Rodríguez-Panadero F, Porcel JM. Accuracy of pleural fluid cytology in malignant effusions. *An Med Interna* 2008;25:173-177

Bielsa S, Porcel JM, Castellote J, Mas E, Esquerda A, Light RW. Solving the Light's criteria misclassification rate of cardiac and hepatic transudates. *Respirology* 2012;17:721-726

Bouillon R, van Schoor NM, Gielen E, Boonen S, Mathieu C, Vanderscheuren C, Lips P. Optimal vitamin D status: a critical analysis on the basis of evidence-based medicine. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:1283-1304

Branscheid D, Krysa S, Bauer E, Bülzebruck H, Schirren J. Diagnostic and therapeutic strategy in malignant pleural mesothelioma. *Eur J Cardiothorac Surg* 1991;5:466-472

Brehm JM, Celedon JC, Soto-Quirós ME, Avila L., Hunninghake GM, Forno E., Laskey D., Silvia JS, Hollis BW, Weiss ST, Litonjua AA. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:765-771

Brehm JM, Schuemann B, Fuhlbrigge AS, Hollis BW, Strunk RC, Zeiger RS, Weiss ST, Litonjua AA. Serum vitamin D levels and severe asthma exacerbations in the Childhood Asthma Management Program study. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:52-85

- Brennan A, Katz DR, Nunn JD, Barker S, Hewison M, Fraher LJ, O'Riordan JL. Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D3 metabolite, dihydroxycholecalciferol. *Immunology* 1987;61:457-461
- Briselli M, Mark EJ, Dickersin GR. Solitary fibrous tumors of the pleura: eight new cases and review of 360 cases in the literature. *Cancer* 1981;47:2678-2689
- Bucki R, Leszcynska K, Namiot A, Sokolowski W. Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide. *Arch Immunol Ther Exp* 2010;58:15-25
- Burgess LJ, Maritz FJ, Taljaard JJ. Comparative analysis of the biochemical parameters used to distinguish between pleural transudates and exudates. *Chest* 1995;107:1604-1609
- Burton MF, Steel PG. The chemistry and biology of LL-37. *Nat Prod Rep* 2009;26:1572-1584
- Butchart EG, Ashcroft T, Barnsley WC, Hoden MP. The role of surgery in diffuse malignant mesothelioma of the pleura. *Semin Oncol* 1981;8:321-328
- Branca P, Rodriguez M, Rogers JT, Ayo DS, Moyers JP, Light RW. Routine measurement of pleural fluid amylase is not indicated. *Arch Intern Med* 2001;161:228-32
- Broaddus VC, Wiener-Kronish JP, Staub NC. Clearance of lung edema into the pleural space of volume-loaded anesthetized sheep. *J Appl Physiol* 1990;68:2623-30
- Bynum LJ, Wilson JE 3rd. Radiographic features of pleural effusions in pulmonary embolism. *Am Rev Respir Dis* 1978;117:829-834
- Campbell Y, Fantacone ML, Gombart AF. Regulation of antimicrobial peptide gene expression by nutrients and by-products of microbial metabolism. *Eur J Nutr* 2012;51:899-907
- Candela A, Andujar J, Hernández L, Martín C, Barroso E, Arriero JM, Romero S. Functional sequelae of tuberculous pleurisy in patients correctly treated. *Chest* 2003;123:1996-2000
- Castañeda-Delgado JE, Miranda-Castro NY, González-Amaro R, González-Curiel I, Montoya-Rosales A, Rivas-Calderón B, Rivas-Santiago B. Production of antimicrobial peptides is preserved in aging. *Clin Immunol* 2013;148:198-205
- Cavina C, Vichi G. Radiological aspects of pleural effusions in medical nephropathy in children. *Ann Radiol Diagn (Bologna)* 1958;31:163-202
- Cederlund A, Gudmundsson GH, Agerberth B. Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J* 2011;276:3942-3951
- Chalmers JD, McHugh BJ, Docherty C, Govan JRW, Hill AT. Vitamin D deficiency is associated with chronic bacterial colonisation and disease severity in bronchiectasis. *Thorax* 2013;68:39-47

Chan CH, Arnold M, Chan CY, Mak TW, Hoheisel GB. Clinical and pathological features of tuberculous pleural effusion and its long-term consequences. *Respiration* 1991;58:171-175

Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, Tracey KJ, Vogl T, Feldmann M, Horwood N, Nanchahal J. Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest* 2012;122:2711-2719

Charan J, Goyal JP, Saxena D, Yadav P. Vitamin D for prevention of respiratory tract infections: A systematic review and meta-analysis. *J Pharmacol Pharmacother* 2012;3:300–303.

Chen YM, Tsai CM, Wang-Peng J. Interleukin-7 and Interleukin-12 have different effects in rescue of depressed cellular immunity: comparison of malignant and tuberculous pleural effusions. *J Interferon Cytokine Res* 2001;21:249-256

Cheng CS, Rodriguez RM, Perrett EA. Vascular Endothelial Growth Factor in pleural fluid. *Chest* 1999;115:760-765

Cheng TYD, LaCroix AZ, Beresford SAA, Goodman GE, Thornquist MD, Zheng Y, Chlebowski RT, Ho GYF, Neuhauser M. Vitamin D intake and lung cancer risk in the Women's Health Initiative. *Am J Clin Nutr* 2013;98:1002-1011

Chernow B, Sahn SA. Carcinomatous involvement of the pleura: an analysis of 96 patients. *Am J Med* 1977;63:695-702

Chheng DC, Ko EC, Yee HT, Shultz JJ, Dorvault CC, Eltoum IA. Malignant pleural effusions due to small-cell lung carcinoma: a cytologic and immunocytochemical study. *Diagn Cytopathol* 2001;25:356-360

Chishimba L, Thickett DR, Stockley RA, Wood AM. The vitamin D axis in the lung: a key role for vitamin D-binding protein. *Thorax* 2010;65:456-462

Chow KM, Szeto CC, Li PK. Management options for hydrothorax complicating peritoneal dialysis. *Semin Dial* 2003;16:389-394

Christakos S, DeLuca HF. Minireview: Vitamin D: is there a role in extraskeletal health?. *Endocrinology* 2011;152:2930-2936

Christakos S., Hewison M., Gardner D.G., Wagner C.L., Sergeev I.N., Rutten E., Pittas A.G., Boland R., Ferrucci L., Bikle D.D. Vitamin D: beyond bone. *Ann N Y Acad Sci* 2013;1287:45-58

Christensen EE, Dietz GW, Ahn CH, Chapman JS, Murry RC, Anderson J, Hurst GA. Initial roentgenographic manifestations of pulmonary *Mycobacterium tuberculosis*, *M kansasii*, and *M intracellularis* infections. *Chest* 1981;80:132-136

Chun RF, Liu PT, Modlin RL, Adams JS, Hewison M. Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis. *Front Physiol* 2014;5(art 151), 15 pg, eCollection

Chun RF, Peercy BE, Orwoll ES, Nielson CM, Adams JS, Hewison M. Vitamin D and DBP: the free hormone hypothesis revisited. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014 (en prensa en Mayo 2014)

Cooray GH. Defensive mechanisms in the mediastinum, with special reference to the mechanics of pleural absorption. *J Pathol Bacteriol* 1949;61:551-567

Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett* 1995;368:173-176

Creaney J, Yeoman D, Naumoff L, Hof M, Segal A, Musk AW, De Klerk N, Horick N, Skates SJ, Robinson BW. Soluble mesothelin in effusions: a useful tool for the diagnosis of malignant mesothelioma. *Thorax* 2007;62:569-576

Cristaudo A, Foddìs R, Vivaldi A, Guglielmi G, Dipalma N, Filiberti R, Neri M, Ceppi M, Paganuzzi M, Ivaldi GP, Mencoboni M, Ambrosino N, Chella A, Mutti L, Puntoni R. Clinical significance of serum mesothelin in patients with mesothelioma and lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:5076-5081

Crowle AJ, Ross EJ, May MH. Inhibition by 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> of the multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. *Infect Immun* 1987;55:2945-2950

Daiger SP, Schanfield MS, Cavalli-Sforza LL. Group-specific component (GC) proteins bind vitamin D and 25-hydroxyvitamin D. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72:2076-2080

Das DK. Serous effusions in malignant lymphomas: a review. *Diagn Cytopathol* 2006;34:335-347

Das M, Tomar N, Screenivas V, Gupta N, Groswami R. Effect of vitamin D supplementation on cathelicidin, IFN- $\gamma$ , IL-4, and Th1/Th2 transcription factors in young healthy females. *Eur J Clin Nutr* 2014;68:338-343

Davies HE, Davies RJ, Davies CW. BTS Pleural Disease Guideline Group. Management of pleural infection in adults. *Thorax* 2010;65(suppl 2):ii41-ii53

Davies HE, Sadler RS, Bielsa S, Maskell NA, Rahman NM, Davies RJ, Ferry BL, Lee YC. Clinical impact and reliability of pleural fluid mesothelin in undiagnosed pleural effusions. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:437-444

Demir M, Uyan U, Keceoclu S, Demir C. The relationship between vitamin D deficiency and pulmonary hypertension. *Prague Med Rep* 2013;114:154-161

Dixon BM, Barker T, McKinnon T, Cuomo J, Frei B, Borregaard N, Gombart AF. Positive correlation between circulating cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18/LL-37) and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy adults. *BMC Res Notes* 2012;5:575 (3 pgs)

Doerr CH, Allen MS, Nichols FC, Ryu JH. Etiology of chylothorax in 203 patients. *Mayo Clin Proc* 2005;80:867-70

Duplantier AJ, van Hoek ML. The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 as a potential treatment for polymicrobial infected wounds. *Front Immunol* 2013;4:art 143 (14 pg)

Eid AA, Keddissi JI, Kinasewitz GT. Hypoalbuminemia as a cause of pleural effusions. *Chest*. 1999;115:1066-1069

Elis A, Blickstein D, Mulchanov I, Manor Y, Radnay J, Shapiro H, Lishner M. Pleural effusion in patients with non-Hodgkin's lymphoma: a case-controlled study. *Cancer* 1998;83:1607-1611

Ellner JJ. Pleural fluid and peripheral blood lymphocyte function in tuberculosis. *Ann Intern Med* 1978;89:932-933

Escudero Bueno C, García Clemente M, Cuesta Castro B, Molinos Martín L, Rodríguez Ramos S, González Panizo A, Martínez Glez-Río J. Cytologic and bacteriologic analysis of fluid and pleural biopsy specimens with Cope's needle. Study of 414 patients. *Arch Intern Med* 1990;150:1190-1194.

Fedullo PF. Pulmonary thromboembolism. In Mason RJ, Broaddus VC, Murray JF eds. *Textbook of respiratory medicine*, 4th edition. WB Saunders, Philadelphia PA USA 2005, pg 1425-1458

Fentiman IS, Millis R, Sexton S, Hayward JL. Pleural effusion in breast cancer: a review of 105 cases. *Cancer* 1981;47:2087-2892

Ferguson GC. Cholesterol pleural effusion in rheumatoid lung disease. *Thorax* 1966;21:577-582

Fine JS, Rojas-Triana A, Jackson JV. Impairment of leukocyte trafficking in a murine pleuritis model by Il-4 and Il-10. *Inflammation* 2003;27:161-174

Finklea JD, Grossmann RE, Tangpricha V. Vitamin D and chronic lung disease. *Adv Nutr* 2011;2:244-253

Finland M, Barnes MW. Changing ecology of acute bacterial empyema: occurrence and mortality at Boston City Hospital during 12 selected years from 1935 to 1972. *J Infect Dis* 1978;137:274-291

Finsen NR. *Om Anvendelse i Medicinen af Koncentrerede Kemiske Lysstråler*. Gyldendalske Boghandels Forlag, Copenhagen, Dinamarca 1898

Fiorelli A, Vicidomini G, Di Domenico M, Napolitano F, Messina G, Morgillo F, Ciardiello F, Santini M. Vascular endothelial growth factor in pleural fluid for differential diagnosis of benign and malignant origin and its clinical applications. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2011;12:420-424

Foong RE, Zusky GR. Vitamin D deficiency and the lung: disease initiator or disease modifier?. *Nutrients* 2013;5:2880-2900

Forli L, Halse J, Haug E, Bjortuft O, Vatn M, Kofstad J, Boe J. Vitamin D deficiency, bone mineral density and weight in patients with advanced pulmonary disease. *J Intern Med* 2004;256:56–62

Fracchia AA, Knapper WH, Carey JT, Farrow JH. Intrapleural chemotherapy for effusion from metastatic breast carcinoma. *Cancer* 1970;26:626-629

Freishtat RJ, Iqbal SF, Pillai DK, Klein CJ, Ryan LM, Benton AS, Teach SJ. High prevalence of vitamin D deficiency among inner-city African American youth with asthma in Washington, DC. *J Pediatr* 2010;156:948–952

Fujiwara H, Tsuyuguchi I. Frequency of tuberculin-reactive T-lymphocytes in pleural fluid and blood from patients with tuberculous pleurisy. *Chest* 1986;89:530-532

Galarza I, Cañete C, Granados A, Estopà R, Manresa F. Randomised trial of corticosteroids in the treatment of tuberculous pleurisy. *Thorax* 1995;50:1305-1307

Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SSL, Daher K, Bainton DF, Lehrer DI. Defensins: natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 1985;76:1427-1435

GEMA Executive Committee. Spanish guideline on the management of asthma 2009. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010;20 supl 1:1-59

Ginde AA, Mansbach JM, Camargo Jr CA. Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Thirth National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Arch Intern Med* 2009;169:384-390

Glazer M, Berkman N, Lafair JS, Kramer MR. Successful talc slurry pleurodesis in patients with nonmalignant pleural effusion. *Chest* 2000;117:1404-1409

Goeminne H, van Meerbeeck JP. Pemetrexed in thoracic cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2006;7:917-928

Goldsmith HS, Bailey HD, Callahan EL, Beattie EJ Jr. Pulmonary lymphangitic metastases from breast carcinoma. *Arch Surg* 1967;94:483-488

Gombart AF, Bhan I, Borregaard N, Tamez H, Camargo CA Jr, Koeffler HP, Thadhani R. Low plasma level of cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18) predicts increased infectious disease mortality in patients undergoing hemodialysis. *Clin Infect Dis* 2009;48:418-424

Gombart AF, Saito T, Koeffler HP. Exaptation of an ancient Alu short interspersed element provides a highly conserved vitamin D-mediated innate immune response in humans and primates. *BMC Genomics* 2009;10:321-332

Good JT Jr, Taryle DA, Maulitz RM, Kaplan RL, Sahn SA. The diagnostic value of pleural fluid pH. *Chest* 1980;78:55-59

- Gottelher A, Taryle DA, Reed CE, Sahn SA. Pleural fluid analysis in malignant mesothelioma. Prognostic implications. *Chest* 1991;100:1003-1006
- Greco S, Girardi E, Masciangelo R. Adenosine deaminase and interferon gamma measurements for the diagnosis of tuberculous pleurisy: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003;7:777-786
- Gumaste V, Singh V, Dave P. Significance of pleural effusion in patients with acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1992;87:871-874
- Gunville C, Mourani PM, Ginde AA. The role of vitamin D in prevention and treatment of infection. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2013;12:239-245
- Halm EA, Teirstein AS. Management of community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 2002;347:2039-2045
- Halstead JC, Lim E, Ritchie AJ. Acute hydrothorax in CAPD. Early thoracoscopic (VATS) intervention allows return to peritoneal dialysis. *Nephron* 2002;92:725-727
- Hamashima Y, Kanazawa T, Hirata A, Yamai Y, Fujihara H, Sekine K, Nagao K. Measurement of vitamin D-binding protein in pleural fluids and sera by means of a turbidimetric immunoassay measuring system. *Clin Chim Acta* 2002;321:23-28
- Harder J, Siebert R, Zhang Y, Mathiesen P, Christophers E, Schlegelberger B, Schroder JM. Mapping of the gene encoding human  $\beta$ -defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1 *Genomics* 1997;46:472-475
- Hassan R, Remaley A, Sampson M, Zhang J, Cox DD, Pingpank J, Alexander R, Willingham M, Pastan I, Onda M. Detection and quantitation of serum mesothelin, a tumour marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:447-453
- Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler CA, Hsieh D, Hsieh JC, Jurutka PW. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcif Tissue Int* 2013;92:77-98
- Havelka AM, Yektaei-Karin E, Hultenby K, Sorensen OE, Lundahl J, Berggren V, Marchini G. Maternal plasma level of antimicrobial peptide LL37 is a major determinant factor of neonatal plasma LL37 level. *Acta Paed* 2010;99:836-841
- Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2005;5:271-283
- He CS, Handzlik M, Fraser WD, Muhamad A, Preston H, Richardson A, Gleeson M. Influence of vitamin D status on respiratory infection incidence and immune function during 4 months of winter training in endurance sport athletes. *Exerc Immunol Res* 2013;19:86-101
- Heffner JE, Brown LK, Barberi CA. Diagnostic value of tests that discriminate between exudative and transudative pleural effusions. *Chest* 1997;111:970-980

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

Heffner JE, Nietert PJ, Barbieri C. Pleural fluid pH as a predictor of survival for patients with malignant pleural effusions. *Chest* 2000;117:79-86

Heller SJ, Noordhoek E, Tenner SM, Ramagopal V, Abramowitz M, Hughes M, Banks PA. Pleural effusion as a predictor of severity in acute pancreatitis. *Pancreas* 1997;15:222-225

Henry HL. Regulation of vitamin D metabolism. *Best Pract Res Clin Endocr Metab* 2011;25:531-541

Herrstedt J, Clementsen P, Hansen OP. Increased myelosuppression during cytostatic treatment and pleural effusion in patients with small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 1992;28:1070-1073

Hewison M. An update of vitamin D and human immunity. *Clin Endocr* 2012;76:315-325

Hillerdal G. Chylothorax and pseudochylothorax. *Eur Respir J* 1997;10:1150-1156.

Hirschfeld J. Immune-electrophoretic demonstration of qualitative differences in human sera and their relation to the haptoglobins. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1959;47:160-168

His HZ, Liang QL, Jiang J. Diagnostic value of carcinoembryonic antigen in malignant pleural effusion: a meta-analysis. *Respirology* 2008;63:35-41

Höck AD. Vitamina D3 deficiency results in dysfunctions of immunity with severe fatigue and depression in a variety of diseases. *In vivo* 2014;28:133-145

Hollis BW. Assessment and interpretation of circulating 25 hydroxyvitamin D and 1,25 dihydroxyvitamin D in the clinical environment. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2010;39:271-286

Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357:266–281

Holick MF, Brinkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon MC, Hanley DA, Heany RP, Murad MH, Weaver CM. Evaluation, treatment and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1911-1930

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

Hua CC, Chang LC, Chen YC, Chang SC. Proinflammatory cytokines and fibrinolytic enzymes in tuberculous and malignant pleural effusions. *Chest* 1999;116:1292-1296

- Hussain T, Nasreen N, Lai Y, Bellew BF, Antony VB, and Mohammed KA. Innate immune responses in murine pleural mesothelial cells: Toll-like receptor-2 dependent induction of  $\beta$ -defensin-2 by staphylococcal peptidoglycan *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;295:461–470
- Hutchinson WB, Friendberg MJ. Intrathoracic mesothelioma. *Radiology* 196;80:937-945
- Ibrahimbacha A, Farah M, Saluja J. An HIV-infected patient with pleural effusion. *Chest* 1999;116:1113-1115
- Iglesias JI, Cobb J, Levey J, Rosiello RA. Recurrent left pleural effusion in a 44-year-old woman with a history of alcohol abuse. *Chest* 1996;110:547-549
- Ihi T, Nakazato M, Mukae H, Matsukura S. Elevated concentrations of Human Neutrophil peptides in plasma, blood and body fluids from patients with infections. *Clin Infect Dis* 1997;25:1134-1140
- Institute of Medicine. Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. The National Academic Press Washington DC USA 2011
- Ishimoto O, Saijo Y, Narumi K, Kimura Y, Ebina M, Matsubara N, Asou N, Nakai Y, Nukiwa T. High level of vascular endothelial growth factor in hemorrhagic pleural effusion of cancer. *Oncology* 2002;63:70-75
- Jackson AS, Shrikrishna D, Kelly JL, Kemp SV, Hart N, Moxham J, Polkey MI, Kemp P, Hopkinson NS. Vitamin D and skeletal muscle strength and endurance in COPD. *Eur Respir J* 2013;41:309-316
- Janda S, Swiston J. Diagnostic accuracy of pleural fluid NT-pro-BNP for pleural effusions of cardiac origin: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pulm Med* 2010;10:58
- Janssens W, Bouillon R, Claes B, Carremans C, Lehouck A, Buysschaert I, Coolen J, Mathieu C, Decramer M, Lambrechts D. Vitamin D deficiency is highly prevalent in COPD and correlates with variants in the vitamin D-binding gene. *Thorax* 2010;65:215–220
- Janssens W, Decramer M, Mathieu C, Korf H. Vitamin D and chronic obstructive pulmonary disease: hype or reality. *Lancet Respir Med* 2013;1:804-812
- Jarczak J, Kosciuczuk EM, Lisowski P, Strzalkowska N, Józwik A, Horbanczuk J, Krzyzewski J, Zwierzchowski L, Bagnicka E. Defensins: natural component of human innate immunity. *Hum Immun* 2013;64:1069-1079
- Jeng L, Yamshchikov AV, Judd SE, Blumberg HM, Martin GS, Ziegler TR, Tangpricha V. Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *J Translat Med* 2009;7:28-36
- Jenkinson F, Murphy MJ. Biochemical analysis of pleural and ascitic fluid: effect of sample timing on interpretation of results. *Ann Clin Biochem* 2007;44:471-473

Jiang Y, Xiao W, Zhang Y, Xing Y. Urokinase-type plasminogen activator system and human cationic antimicrobial protein-18 in serum and induced sputum of patients with obstructive pulmonary disease. *Respirology* 2010;15:939-946

Johnston RF, Loo RV. Hepatic hydrothorax. Studies to determine the source of the fluid and report of thirteen cases. *Ann Intern Med* 1964;61:385-401

Johnston WW, Frable WJ. The cytopathology of the respiratory tract. A review. *Am J Pathol* 1976;84:372-424

Jolliffe DA, Griffiths CJ, Martineau AR. Vitamin D in the prevention of acute respiratory infection: systematic review of clinical studies. *J Steroid Biochem Mol Med* 2012;136:321-329

Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. Cytochrome P-450-mediated metabolism of vitamin D. *J Lipid Res* 2014;51:13-31

Joseph J, Viney S, Beck P, Strange G, Sahn SA, Basran GS. A prospective study of amylase-rich pleural effusions with special reference to amylase isoenzyme analysis. *Chest* 1992;102:1455-1459

Kakizaki S, Katakai K, Yoshinaga T, Higuchi T, Takayama H, Takagi H, Nagamine T, Mori M. Hepatic hydrothorax in the absence of ascites. *Liver* 1998;18:216-220

Kalomendis I, Guo Y, Peebles RS. Pneumothorax-Associated pleural eosinophilia in mice is interleukin-5 but not Interleukin-13 dependent. *Chest* 2005;128:2978-2983

Kalomendis I, Stathopoulos GT, Barnette R. Eotaxin-3 and Interleukin-5 pleural fluid levels are associated with pleural fluid eosinophilia in post-coronary artery bypass grafting pleural effusions. *Chest* 2005;127:2094-2100

Kamble R, Wilson CS, Fassas A, Desikan R, Siegel DS, Tricot G, Anderson P, Sawyer J, Anaissie E, Barlogie B. Malignant pleural effusion of multiple myeloma: prognostic factors and outcome. *Leuk Lymphoma* 2005;46:1137-1142

Kanda N, Ishikawa T, Kamata M, Tada Y, Watanabe S. Increased serum leucine, leucine-37 levels in psoriasis: positive and negative feedback loops of leucine, leucine-37 and pro- and anti-inflammatory cytokines. *Hum Immunol* 2010;71:1161-1171

Kawashima A, Libshitz HI. Malignant pleural mesothelioma: CT manifestations in 50 cases. *AJR Am J Roentgenol* 1990;155:965-969

Kaye MD. Pleuropulmonary complications of pancreatitis. *Thorax* 1968;23:297-306

Khoo AL, Chai L, Koenen H, Joosten I, Netea M, van der Ven A. Translating the role of vitamin D3 in infectious diseases. *Crit Rev Microbiol* 2012;38:122-135

- Kinasewitz GT. Transudative effusions. *Eur Respir J* 1997;10:714-718
- Klempman S. The exfoliative cytology of diffuse pleural mesothelioma. *Cancer* 1962;15:691-704
- Kolditz M , Halank M , Schiemanck CS , Schmeisser A , Höffken G. High diagnostic accuracy of NT-proBNP for cardiac origin of pleural effusions. *Eur Respir J* 2006;28:144-150
- Kramer M. High amylase levels in neoplasm related pleural effusion. *Ann Intern Med* 1989;110:567-569
- Kunisaki KM, Niewoehner DE, Connett JE. Vitamin D levels and risk of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: A Prospective Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:286–290
- Lai CL, Tsai CM, Tsai TT, Kuo BI, Chang KT, Fu HT, Perng RP, Chen JY. Presence of serum anti-p53 antibodies is associated with pleural effusion and poor prognosis in lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 1998;4:3025-3030
- Lai-Fook SJ. Pleural mechanics and fluid exchange. *Physiol Rev.* 2004;84:385-410
- Lankisch PG, Droge M, Becher R. Pleural effusions: a new negative prognostic parameter for acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol.* 1994;89:1848-1851
- Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun* 1995;63:1291-1297
- Larrick JW, Morgan JG, Palings I, Hirata M, Yen MH. Complementary DNA sequence of rabbit CAP18-a unique lipopolysaccharide binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;179:170-175
- Lavender TW, Martineau AR, Quinton R, Schwab U. Severe hypercalcemia following vitamin D replacement for tuberculosis-associated hypovitaminosis D. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012;16:140
- Lazaridis KN, Frank JW, Krowka MJ, Kamath PS. Hepatic hydrothorax: pathogenesis, diagnosis, and management. *Am J Med* 1999;107:262-267
- Leckie WJ, Tothill P. Albumin turnover in pleural effusions. *Clin Sci* 1965;29:339-352
- Lee YC, de Klerk NH, Henderson DW. Malignant mesothelioma. En: Hendrick D, Burge S, Beckett B eds. *Occupational disorders of the lung.* WB Saunders, Philadelphia PA, USA 2001
- Lehouck A, Mathieu C, Carremans C, Baeke F, Verhaegen J, van Eldere J, Decallonne B, Bouillon R, Decramer M, Janssens W. High doses of vitamin D to reduce exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. A randomized trial. *Ann Intern Med* 2012;156:105-114

Leow L, Simpson T, Cursons R, Karalus N, Hancox RJ. Vitamin D, innate immunity and outcomes in community acquired pneumonia. *Respirology* 2011;16:611-616

Lesho EP, Roth BJ. Is pH paper an acceptable low cost alternative to the blood gas analyser for determining pleural fluid pH? *Chest* 1997;112:1291-1292

Levine H, Szanto PB, Cugell DW. Tuberculous pleurisy. An acute illness. *Arch Intern Med* 1968;122:329-332

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

Liang QL, Shi HZ, Wang K, Qin SM, Qin XJ. Diagnostic accuracy of adenosine deaminase in tuberculous pleurisy: a meta-analysis. *Respir Med* 2008;102:744-754

Lieberman FL, Hidemura R, Peters RL, Reynolds TB. Pathogenesis and treatment of hydrothorax complicating cirrhosis with ascites. *Ann Intern Med* 1966;64:341-51

Light RW. *Pleural Diseases*. Lippincott. Williams and Wilkins, Wolters Kluwer 2007

Light RW. The Light criteria. The beginning and why they are useful 40 years later. *Clin Chest Med* 2013;34:21-26

Light RW. Establishing the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Arch Intern Med*. 1998;158:1967-1968.

Light RW. Management of parapneumonic effusions. *Arch Intern Med*. 1981;141:1339-1341

Light RW, Ball Jr WC. Glucose and amylase in pleural effusions. *J Am Med Assoc* 1973;225:257-60

Light RW, Ball Jr WC. Lactate dehydrogenase isoenzymes in pleural effusions. *Am Rev Respir Dis* 1973;108:660-664

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

Light RW, Girard WM, Jenkinson SG, George RB. Parapneumonic effusions. *Am J Med* 1980;69:507-512

Light RW, Hamm H. Malignant pleural effusion: would the real cause please stand up? *Eur Respir J* 1997;10:1701-1702

Light RW, Jenkinson SG, Minh VD, George RB. Observations on pleural fluid pressures as fluid is withdrawn during thoracentesis. *Am Rev Respir Dis* 1980;121:799-804

Light RW, Macgregor I, Luchsinger PC, Ball Jr WC. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med* 1972;77:507-513

Lippross S, Klueter T, Steubesand N, Oestern S, Mentlein R, Hildebrandt F, Podschum R, Pufe T, Seekamp A, Varoga D. Multiple trauma induces serum production of host defence peptides. *Injury* 2011;43:137-142

Little AG, Kadowaki MH, Ferguson MK, Staszek VM, Skinner DB. Pleuro-peritoneal shunting. Alternative therapy for pleural effusions. *Ann Surg* 1988;208:443-450

Liu PT, Schenck M, Walker VP, Dempsey PW, Kanchanapoomi M, Wheelwright M, Varzinia A, Zhang X, Steinmeyer A, Zügel U, Hollis BW, Cheng G, Modlin RL. Convergence of IL-1 $\beta$  and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. *PLoS One* 2009;4:e5810 (13 pgs)

Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zügel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom B.R., Modlin R.L. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006;311:1770-1773

Liu S, He LR, Wang W, Wang GH, He ZY. Prognostic value of plasma human  $\beta$ -defensin 2 levels on short-term clinical outcomes in patients with community-acquired pneumonia: a preliminary study. *Respir Care* 2013;58:655-661

Llach F, Arieff AI, Massry SG. Renal vein thrombosis and nephrotic syndrome. A prospective study of 36 adult patients. *Ann Intern Med* 1975;83:8-14

Lloyd CM, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in asthma. *Immunity* 2009;31:438-449.

Long AC, O'Neal HR, Peng S, Lane KB, Light RW. Comparison of pleural fluid N-terminal pro-brain natriuretic peptide and brain natriuretic-32 peptide levels. *Chest* 2010;137:1369-1374

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

Lowery EM, Bemiss B, Cascino T, Durazo-Arvizu RA, Forsythe SM, Alex C, Laghi F, Love RB, Camacho P. Low vitamin D levels are associated with increased rejection and infections after lung transplantation. *J Heart Lung Transpl* 2012;31:700-707

Lowry MB, Guo C, Borregaard N, Gombart AF. Regulation of the human cathelicidin antimicrobial peptide gene by 1 $\alpha$ -25 dihydroxyvitamin D3 in primary immune cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014;143C:183-191

- Marel M, Zrůstová M, Stasný B, Light RW. The incidence of pleural effusion in a well-defined region. Epidemiologic study in central Bohemia. *Chest* 1993;104:1486-1489
- Martineau AR. Old wine in new bottles: vitamin D in the treatment and prevention of tuberculosis. *Proc Nutr Soc* 2012;71:84-89
- Martineau AR, Wilkinson RJ, Wilkinson KA, Newton SM, Kampmann B, Hall BM, Packe GE, Davidson RN, Eldridge SM, Maunsell ZJ, Rainbow SJ, Berry JL, Griffiths CJ. A single dose of vitamin D enhances immunity to mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:208–213
- Maskell NA, Batt S, Hedley EL, Davies CW, Gillespie SH, Davies RJ. The bacteriology of pleural infection by genetic and standard methods and its mortality significance. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:817-823
- Maskell NA, Gleeson FV, Darby M, Davies RD. Diagnostically significant variations in pleural fluid pH in loculated parapneumonic effusions. *Chest* 2004;126:2022-2024
- Matzner M, Al Samie AR, Winkler HM, Nemeth J, Grasnek A, Indra A, Bieglner C, Winkler S. Low serum levels of cathelicidin LL-37 in leprosy. *Acta Trop* 2011;117:56-59
- Miglioli PA, Allerberger F, Walderberg I, Hasse J. Antibacterial activity of human pleural fluid: alone and in combination with antibiotics. *Int J Antimicrob Agents* 1998;10:317-319
- Miller TA, Lindenauer SM, Frey CF, Stanley JC. Proceedings: Pancreatic abscess. *Arch Surg* 1974;108:545-551
- Miserocchi G. Mechanisms controlling the volume of pleural fluid and extravascular lung water. *Eur Respir Rev* 2009;18:244-252
- Miserocchi G, Agostoni E. Contents of the pleural space. *J Appl Physiol*. 1971;30:208-213
- Mohammed KA, Nasreen N, Hardwick J, Van Horn RD, Sanders KL, Antony VB. *Mycobacteria* induces pleural mesothelial permeability by down-regulating  $\beta$ -catenin expression. *Lung* 2003;181:57-66
- Mohammed KA, Nasreen N, Ward MJ, Mubarak KK, Rodriguez-Panadero F, Antony VB. *Mycobacterium*-mediated chemokine expression in pleural mesothelial cells: role of C-C chemokines in tuberculous pleurisy. *J Infect Dis* 1998;178:1450-1456
- Moller S, Laigaard F, Olgaard K, Hemmingsen C. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in experimental sepsis. *Int J Med Sci* 2007;4:190-195
- Morcos MM, Gabr AA, Samuel S, Kamel M, el Baz M, el Beshry M, Michail LL. Vitamin D administration to tuberculous children and its value. *Boll Chim Farm* 1998;137:157–164

Moudgil H, Sridhar G, Leitch AG. Reactivation disease: the commonest form of tuberculous pleural effusion in Edinburgh, 1980-1991. *Respir Med* 1994;88:301-304

Murdoch DR, Slow S, Chambers ST, Jennings LC, Stewart AW, Priest PC, Florkowski CM, Livesey JH, Camargo Jr CA, Scragg R. Effect of vitamin D3 supplementation on upper respiratory tract infections in healthy adults. The VIDARIS randomized controlled trial. *JAMA* 2012;308:1333-1339

Nahid P, Broaddus VC. Liquid and protein exchange. In: Light RW, Lee YC eds. *Textbook of pleural diseases* Chapter 3. Arnold Publishers, London UK 2003 pg 33-34.

Naito T, Satoh H, Ishikawa H, Yamashita YT, Kamma H, Takahashi H, Ohtsuka M, Hasegawa S. Pleural effusion as a significant prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 1997;17:4743-4746

Nakamura Y, Ozaki T, Kamei T. Factors that stimulate the proliferation and survival of eosinophils in eosinophilic pleural effusion: relationship to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, interleukin-5 and interleukin-3. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;8:605-611

Nakatsuka S, Yao M, Hoshida Y, Yamamoto S, Iuchi K, Aozasa K. Pyothorax-associated lymphoma: a review of 106 cases. *J Clin Oncol* 2002;20:4255-4260

Nash DR, Wallace RJ Jr. Immunoglobulin E and other immunoglobulins in patients with eosinophilic pleural effusions. *J Lab Clin Med* 1958;106:512-516

Neila Calvo S, Nan Nan D, García Ibarbia C, Olmos Martínez JM, González Macías J, Hernández Hernández JL. La realidad de la osteoporosis en el paciente hospitalizado en Medicina Interna. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2013;5:141-145

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Sixth Edition. 2012 W H Freeman & Co, McMillan Publishing Group, Oxford UK

Nguyen HB, Eshete B, Lau KH, Sai A, Villarin M, Baylink D. Serum 1,25-dihydroxyvitamin D: an outcome prognosticator in human sepsis. *PLoS One* 2013;8:e64348

Nomoto Y, Suga T, Nakajima K, Sakai H, Osawa G, Ota K, Kawaguchi Y, Sakai T, Sakai S, Shibata M. Acute hydrothorax in continuous ambulatory peritoneal dialysis-a collaborative study of 161 centers. *Am J Nephrol* 1989;9:363-367

Nursyam EW, Amin Z, Rumende CM. The effect of vitamin D as supplementary treatment in patients with moderately advanced pulmonary tuberculous lesion. *Acta Med Indones* 2006;38:3-5

Nylén F, Miraglia E, Cederlund A, Ottosson H, Strömberg R, Gudmundsson GH, Agerberth B. Boosting innate immunity: development and validation of a cell-based screening assay to identify LL-37 inducers. *Innate Immun* 2014;20:367-376

Okada F, Ando Y, Kondo Y, Matsumoto S, Maeda T, Mori H. Thoracic CT findings of adult T-cell leukemia or lymphoma. *AJR Am J Roentgenol* 2004;182:761-767

Okike N, Bernatz PE, Woolner LB. Localized mesothelioma of the pleura: benign and malignant variants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1978;75:363-372

Okumura K. Cathelicidins. Therapeutic antimicrobial and antitumor host defense peptide for oral diseases. *J Dent Sci Rev* 2011;47:67-84

Olbrich P, Pavon A, Rosso ML, Molinos A, De Felipe B, Sanchez B, Praena Fernandez JM, Jimenez F, Obando I, Neth O. Association of human  $\beta$ -defensin-2 levels and sepsis in preterm neonates. *Pediatr Crit Care Med* 2013;14:796-800

Ong A, Creasman J, Hopewell PC, Gonzalez LC, Wong M, Jasmer RM, Daley CL. A molecular epidemiological assessment of extrapulmonary tuberculosis in San Francisco. *Clin Infect Dis* 2004;38:25-31

Ozsu S, Abul Y, Mentese A, Bektas H, Uzun A, Ozlu T, Porcel JM. Pentraxin-3: A novel biomarker for discriminating parapneumonic from other exudative effusions. *Respirology* 2013;18:657-662

Pass HI, Levin SM, Harbut MR. Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma. *N Eng J Med* 2012;367:1417-1427

Pace E, Gjomarkaj M, Melis M. Interleukin-8 induces Lymphocyte chemotaxis in pleural space. Role of pleural Macrophages. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1592-1599

Palmer BF. Nephrotic edema-pathogenesis and treatment. *Am J Med Sci* 1993;306:53-67

Parameswaran S, Brown LV, Ibbott GS, Lai-Fook SJ. Hydraulic conductivity, albumin reflection and diffusion coefficients of pig mediastinal pleura. *Microvasc Res* 1999;58:114-127

Park KJ, Hwang SC, Sheen SS, Oh YJ, Han JH, Lee KB. Expression of matrix metalloproteinase-9 in pleural effusions of tuberculosis and lung cancer. *Respiration* 2005;72:166-175

Pettersson T, Klockars M, Hellstrom PE. Chemical and immunological features of pleural effusions: comparison between rheumatoid arthritis and other diseases. *Thorax* 1982;37:354-361

Pinheiro da Silva F, Machado MCC. Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides* 2012;36:308-314

Pinheiro da Silva F, Rodrigues Medeiros MC, Gomes dos Santos AB, Alves Ferreira M, Garippo AL, Chammas R, Caldini R, Velasco IT, Possolo de Sousa H, Machado MCC. Neutrophils LL37 migrate to the nucleus during overwhelming infection. *Tissue Cell* 2013;45:318-320

Pisani RJ, Colby TV, Williams DE. Malignant mesothelioma of the pleura. *Mayo Clin Proc* 1988;63:1234-1244

Pistolesi M, Miniati M, Giuntini C. Pleural liquid and solute exchange. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:825-847

Pletz MW, Terkamp C, Schumacher U, Rohde G., Schutte H, Welte T, Bals R. Vitamin D deficiency in community-acquired pneumonia. Low levels of 1,25 (OH)<sub>2</sub> D are associated with disease severity. *Respir Res* 2014;15:53 (PDF provisional Mayo 2014)

Porcel JM. Pleural fluid biomarkers. Beyond the Light criteria. *Clin Chest Med* 2013;34:27-37

Porcel JM , Chorda J , Cao G , Esquerda A , Ruiz-González A , Vives M . Comparing serum and pleural fluid pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) levels with pleural-to-serum albumin gradient for the identification of cardiac effusions misclassified by Light's criteria. *Respirology* 2007;12:654-659

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;21:419-423

Porcel JM, Bielsa S, Esquerda A, et al. Pleural fluid C-reactive protein contributes to the diagnosis and assesment of severity of parapneumonic effusions. *Eur J Intern Med* 2012;23:447-450

Porcel JM, Light RW. Pleural effusions. *Disease-a-month* 2013;59:29-57

Porcel JM, Martínez-Alonso M, Cao G, Bielsa S, Sopena A, Esquerda A. Biomarkers of heart failure in pleural fluid. *Chest* 2009;136:671-677

Porcel JM, Ordi-Ros J, Esquerda A, Vives M, Madroñero AB, Bielsa S, Vilardell Tarres M, Light RW. Antinuclear antibody testing in pleural fluid for the diagnosis of lupus pleuritis. *Lupus* 2007;16:25-27

Porcel JM, Vives M. Distribution of pleural effusion in congestive heart failure. *South Med J* 2006;99:98-99

Porcel JM, Vives M , Cao G , Esquerda A , Rubio M , Rivas MC. Measurement of pro-brain natriuretic peptide in pleural fluid for the diagnosis of pleural effusions due to heart failure. *Am J Med* 2004;116:417-420

Porcel JM, Vives M, Esquerda A, Salud A, Pérez B, Rodríguez-Panadero F. 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;126:1757-1763

Potts DE, Taryle A, Sahn SA. The glucose-pH relationship in parapneumonic effusions. *Arch Intern Med* 1978;138:1378-1380

- Powe CE, Evans MK, Wenger J, Zonderman AB, Berg AH, Nalls M, Tamez H, Zhang D, Bhan I, Karumanchi A, Powe NR, Thadani. Vitamin D binding protein and vitamin D status of black Americans and white Americans. *E Engl J Med* 2013;369:1991-2000
- Price B. Analysis of current trends in United States mesothelioma incidence. *Am J Epidemiol* 1997;145:211-218
- Priehl B, Treiber G, Pieber TR, Amrein K. Vitamin D and immune function. *Nutrients* 2013;2502-2521
- Proveddini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science* 1983;221:1181-1183
- Puhan MA, Siebeling L, Frei A, Zoller M, Bischoff-Ferrari H, Ter Rier G. No association of 25-hydroxyvitamin D with exacerbations in primary care patients with COPD. *Chest* 2014;145:37-43
- Qin XJ, Shi HZ, Huang ZX. Interleukin-16 in tuberculous and malignant pleural effusions. *Eur Respir J*. 2005;25:605-611
- Raab W. Tuberculous empyema treated with vitamin A-D concentrate. *Chest* 1946;12:68-71
- Raboo E, Ramunssen KN, Terkildsen TC. A study of the isoenzymes of lactic dehydrogenase in pleural effusions. *Scand J Respir Dis* 1966;47:150-156
- Rahman NM, Mishra EK, Davies HE, Davies RJ, Lee YC. Clinically important factors influencing the diagnostic measurement of pleural fluid pH and glucose. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:483-490
- Ralph AP, Lucas RM, Norval M. Vitamin D and solar ultraviolet radiation in the risk and treatment of tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2013;13:77-88
- Rami-Porta R, Crowley JJ, Goldstraw P. The revised TNM staging system for lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2009;15:4-9
- Rees JR, Hendriks K, Barry EL, Peacock JL, Mott LA, Sandler RS, Bresalier RS, Goodman M, Bostick RM, Baron JA. Vitamin D3 supplementation and upper respiratory tract infections in a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* 2013;57:1384-1392
- Remelts HH, Spoorenberg SMC, Oosterheert JJ, Bos WJW., de Groot MCH, van den Garde EMW. The role of vitamin D supplementation in the risk of developing pneumonia three independent case/control studies. *Thorax* 2013;68:990-996
- Rena O, Filosso PL, Papalia E, Molinatti M, Di Marzio P, Maggi G, Oliaro A. Solitary fibrous tumour of the pleura: surgical treatment. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001;19:185-189

Rodriguez Panadero F. Lung cancer and ipsilateral pleural effusion. *Ann Oncol* 1995;6(suppl 3):25-27

Robinson BW, Creaney J, Lake R, Nowak A, Musk AW, de Klerk N, Winzell P, Hellstrom KE, Hellstrom I. Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma. *Lancet* 2003;362:1612-1616

Rockey DC, Cello JP. Pancreaticopleural fistula. Report of 7 patients and review of the literature. *Medicine* 1990;69:332-344

Romano M, Libshitz HI. Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma: plain chest radiographs and chest computed tomography of thoracic involvement in previously untreated patients. *Radiol Med* 1998;95:49-53

Romero-Candeira S, Fernandez C, Martin C, Sanchez Paya J, Hernandez L. Influence of diuretics on the concentration of proteins and other components of pleural transudates in patients with heart failure. *Am J Med* 2001;110:681-686

Rook GA, Steele L, Fraher S, Barker R, Karmali J, O'Riordan J, Stanford J. Vitamin D<sub>3</sub>,  $\gamma$ -interferon and control of proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Immunology* 1986;57:159-163

Rosen CJ, Adams JS, Bikle DD, Black DM, Dermay MB, Manson JE, Murad MH, Kovacs CS. The non skeletal effects of vitamin D: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 2012;33:456-492

Rossi GA, Balbi B, Manca F. Tuberculous pleural effusions. Evidence for selective presence of PPD-specific T-lymphocytes at site of inflammation in the early phase of the infection. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:575-579

Rössle M, Ochs A, Gülberg V, Siegerstetter V, Holl J, Deibert P, Olschewski M, Reiser M, Gerbes AL. A comparison of paracentesis and transjugular intrahepatic portosystemic shunting in patients with ascites. *N Engl J Med* 2000;342:1701-1707

Ruiz E, Aleman C, Alegre J, Monasterio J, Segura RM, Armadans L, Vazquez A, Soriano T, Fernandez de Sevilla T. Angiogenic factors and angiogenesis inhibitors in exudative pleural effusions. *Lung* 2005;183:185-195

Sahn SA. Diagnosis and management of parapneumonic effusions and empyema. *Clin Infect Dis* 2007;45:1480-1486

Sahn SA. Pleural disease induced by drugs. In: Camus P, Rosenow ED (eds) *Drug induced and iatrogenic respiratory disease*. Hodder A. London UK, 2011 pg 248-296

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

Sahn SA, Good JTJ. Pleural fluid pH in malignant effusions. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Ann Intern Med* 1988;108:345-349

- Sahn SA, Heffner JE. Pleural fluid analysis. In: Light RW, Lee YCG, eds. Textbook of pleural diseases. 2nd ed. Arnold Press, London UK. 2008 pg 209-226
- Saito R, Rai T, Saito H, Abe K, Takahashi A, Takiguchi J, Ohira H. Two cases of intractable hepatic hydrothorax successfully treated with nasal CPAP. Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi 2006;103:1146-1151
- Sallach SM, Sallach JA, Vasquez E, Schultz L, Kvale P. Volume of pleural fluid required for diagnosis of pleural malignancy. Chest 2002;122:1913-1917
- Sandvliet RH, Heysteeg M, Paul MA. A large thoracic mass in a 57-year-old patient. Solitary fibrous tumor of the pleura. Chest 2000;117:897-900
- Sase SA, Jadus MR, Kukes GD. Pleural fluid Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 correlates with pleural fibrosis in experimental empyema. Am J Respir Crit Care Med 2003;168:700-705
- Shaheen SO, Jameson KA, Robinson SM, Boucher BJ, Syddall HE, Sayer A, Cooper C, Holloway JW, Dennison EM. Relationship of vitamin D status to adult lung function and COPD. Thorax 2011;66:692-698
- Sherpereel A, Grigoriu B, Conti M, Gey T, Gregoire M, Copin MC, Devos P, Chahine B, Porte H, Lassalle P. Soluble mesothelin-related peptides in the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. Am J Respir Crit Care Med 2006;173:1155-1157
- Sherr HP, Light RW, Merson MH, Wolf RO, Taylor LL, Hendrix TR. Origin of pleural fluid amylase in oesophageal rupture. Ann Intern Med 1972;76:985-986
- Shin DM, Yuk JM, Lee HM, Son JW, Harding CV, Kim JM, Modlin RL, Jo EK. Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signaling. Cell Microbiol 2010;12:1648-1665
- Shimizu K, Yoshida J, Nagai K, Nishimura M, Yokose T, Ishii G, Nishiwaki Y. Visceral pleural invasion classification in non-small cell lung cancer: a proposal on the basis of outcome assessment. J Thorac Cardiovasc Surg 2004;127:1574-1578
- Shimokata K, Saka H, Murate T. Cytokine content in pleural effusion. Chest 1991;99:1103-1107
- Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu D, Conway BAD, Greenberh EP, Valore EV, Welsh MJ, Ganz T, Tack BF, McCray Jr PB. Production of  $\beta$ -defensins by human airway epithelia. Proc Nat Acad Sci USA 1998;95:14961-14966
- Small PM, Fujiwara PI. Management of tuberculosis in the United States. N Engl J Med 2001;345:189-200
- Sorensen O, Cowland JB, Askaa J, Borregaard N. An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. J Immunol Meth 1997;206:53-59

Spriggs AI, Boddington MM. The cytology of effusions, 2nd ed. Grune and Stratton, New York NY USA 1968

Staats BA, Ellefson RD, Budahn LL, Dines DE, Prakash UD, Offord K. The lipoprotein profile of chylous and non-chylous pleural effusions. *Mayo Clin Proc* 1980;55:700-704

Stead WW, Eichenholz A, Stauss HK. Operative and pathologic findings in twenty-four patients with syndrome of idiopathic pleurisy with effusion, presumably tuberculous. *Am Rev Tuberc* 1955;71:473-502

Stein PD, Athanasoulis C, Greenspan RH, Henry JW. Relation of plain chest radiographic findings to pulmonary arterial pressure and arterial blood oxygen levels in patients with acute pulmonary embolism. *Am J Cardiol* 1992;69:394-396

Stewart PB. The rate of formation and lymphatic removal of fluid in pleural effusions. *J Clin Invest* 1963;42:258-62

Stolberg HO, Patt NL, Macewen KF, Warwick OH, Brown TC. Hodgkin's disease of the lung. Roentgenologic-pathologic correlation. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1964;92:96-115

Sugiura S, Ando Y, Minami H, Ando M, Sakai S, Shimokata K. Prognostic value of pleural effusion in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3:47-50

Sundar IK, Hwang JW, Wu S, Sun J, Rahman I. Deletion of vitamin D receptor leads to premature emphysema/COPD by increased matrix metalloproteinases and lymphoid aggregates formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;406:127-133

Sundaram ME, Coleman LA. Vitamin D and influenza. *Adv Nutr* 2012;3:517-525

Sutherland ER, Goleva E, Jackson LP, Stevens AD, Leung DY. Vitamin D levels, lung function, and steroid response in adult asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:699-704

Takahama M, Kushibe K, Kawaguchi T, Kimura M, Taniguchi S. Video-assisted thoracoscopic surgery is a promising treatment for solitary fibrous tumor of the pleura. *Chest* 2004;125:1144-1147

Tang S, Chui WH, Tang AW, Li FK, Chau WS, Ho YW, Chan TM, Lai KN. Video-assisted thoracoscopic talc pleurodesis is effective for maintenance of peritoneal dialysis in acute hydrothorax complicating peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:804-808

Taryle DA, Potts DE, Sahn SA. The incidence and clinical correlates of parapneumonic effusions in pneumococcal pneumonia. *Chest* 1978;74:170-173

Tateishi U, Müller NL, Johkoh T, Onishi Y, Arai Y, Satake M, Matsuno Y, Tobinai K. Primary mediastinal lymphoma: characteristic features of the various histological subtypes on CT. *J Comput Assist Tomogr* 2004;28:782-789

Teclé T, Tripathi S, Hartshorn KL. Defensins and cathelicidins in lung immunity. *Innate Imm* 2010;13:151-159

Telvi L, Jaybert F, Eyquem A, Andreux JP, Labrousse F, Chretien J. Study of immunoglobulins in pleura and pleural effusions. *Thorax* 1979;34:389-392

Thomas M.K., Lloyd-Jones D.M., Thadhani R.I., Shaw A., Deraska D.J., Kitchi B.T., Vamvakas E.C., Dick I.M., Prince R.L., Finkelstein J.S. Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N Engl J Med* 1998;338:777-783

Tiosano D, Wildbaum G, Gepstein V, Verbitsky O, Weisman Y, Karin N, Eztioni A. The role of vitamin D receptor in innate and adaptive immunity: A study in hereditary vitamin D-resistant rickets patients. *J Clin Endocrin Metab* 2013;98:1685-1693

Tomcsányi J, Nagy E, Somló M, Moldvay J, Bezzegh A, Bózsik P, Strausz J. NT-brain natriuretic peptide levels in pleural fluid distinguish between pleural transudates and exudates. *Eur J Heart Fail* 2004;6:753-756

Trajman A, Pai M, Dheda K, van Zyl Smit R, Zwerling AA, Joshi R, Kalantri S, Daley P, Menzies D. Novel tests for diagnosing tuberculous pleural effusion: what works and what does not?. *Eur Respir J* 2008;31:1098-1106

Tu CY, Hsu WH, Hsia TC, Chen HJ, Chiu KL, Hang LW, Shih CM. The changing pathogens of complicated parapneumonic effusions or empyemas in a medical intensive care unit. *Intensive Care Med* 2006;32:570-576

Ulrik CS, Viskum K. Fibrous pleural tumour producing 171 litres of transudate. *Eur Respir J* 1998;12:1230-1232

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

Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol* 2012;280:22-35

Van Gelder T, Damhuis RA, Hoogsteden HC. Prognostic factors and survival in malignant pleural mesothelioma. *Eur Respir J* 1994;7:1035-1038

Vieta JO, Craver LF. Intrathoracic manifestations of the lymphomatoid diseases. *Radiology* 1941;92:96-115

Voss E, Whekamp J, Whekamp K, Stange EF, Schroder JM, Harder J. NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human  $\beta$ -defensin-2. *J Biol Chem* 2006;281:2005-2011

Wang DY, Yang PC, Yu WL, Kuo SH, Su NY. Serial antinuclear antibodies titre in pleural and pericardial fluid. *Eur Respir J* 2000;15:1106-1110

Wang NS. Anatomy of the pleura. *Clin Chest Med* 1998;19:229-240

Wang PM, Lai-Fook SJ. Regional pleural filtration and absorption measured by fluorescent tracers in rabbits. *Lung* 1999;177:289-309

Wang TT, Dabbas B, Laperriere D, Bitton AI, Soualhine H, Tavera-Mendoza LE, Dionne S, Servant MI, Bitton A, Seidman EG, Mader S, Behr MA, White JH. *J Biol Chem* 2010;285:2227-2231

Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, Tavera-Mendoza L, Lin R, Hanraban JH, Mader S, White JH. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol* 2004;173:2909-2912

Wang Y, Zhu Z, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor?. *Arch Biochem Biophys* 2012;523:123-133

Wayse V, Yousafzai A, Mogale K, Filteau S. Association of subclinical vitamin D deficiency with severe acute lower respiratory infection in Indian children under 5 years. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:563-567

Weese WC, Shindler ER, Smith IM. Empyema of the thorax then and now. *Arch Intern Med* 1973;131:516-520

Weinberg A, Jin G, Sieg S, McCormick TS. The Yin and Yang of human  $\beta$ -defensins in health. *Front Immunol* 2012;3:1-9

Weynand B, Noël H, Goncette L, Noirhomme P, Collard P. Solitary fibrous tumor of the pleura: a report of five cases diagnosed by transthoracic cutting needle biopsy. *Chest* 1997;112:1424-1428

Widrich WC, Johnson WC, Robbins AH, Nabseth DC. Esophagogastric variceal hemorrhage: its treatment by percutaneous transephatic coronary vein occlusion. *Arch Surg* 1978;113:1331-1338

Widström O, Nilsson BS. Pleurisy induced by intrapleural BCG in immunized guinea pigs. *Eur J Respir Dis* 1982;63:425-434

Widström O, Nilsson BS. Low in vitro response to PPD and PHA in lymphocytes from BCG-induced pleurisy in guinea pigs. *Eur J Respir Dis* 1982;63:435-441

Wiener-Kronish JP, Broaddus VC. Interrelationship of pleural and pulmonary interstitial liquid. *Annu Rev Physiol* 1993;55:209-226

Wiener-Kronish JP, Broaddus VC, Albertine KH, Gropper MA, Matthay MA, Staub NC. Relationship of pleural effusions to increased permeability pulmonary edema in anesthetized sheep. *J Clin Invest* 1988;82:1422-1429

Wiener-Kronish JP, Goldstein R, Matthay RA, Biondi JW, Broaddus VC, Chatterjee K, Matthay MA. Lack of association of pleural effusion with chronic pulmonary arterial and right atrial hypertension. *Chest* 1987;92:967-970

Wiener-Kronish JP, Matthay MA, Callen PW, Filly RA, Gamsu G, Staub NC. Relationship of pleural effusions to pulmonary hemodynamics in patients with congestive heart failure. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:1253-1256

Wiener-Kronish JP, Sakuma T, Kudoh I, Pittet JF, Frank D, Dobbs L, Vasil ML, Matthay MA. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* 1993;75:1661-1669

Wilcox ME, Chong CA, Stanbrook MB, Tricco AC, Wong C, Straus SE. Does this patient have an exudative pleural effusion? The rational clinical Examination Systematic Review. *JAMA* 2014;311:2422-2431.

Wilkinson RJ, Llewelyn M, Toossi Z, Patel P, Pasvol G, Lalvani A, Wright D, Latif M, Davidson RN. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet* 2000;355:618–621

Williams CJB. On the use and administration of cod liver oil in pulmonary consumption. *London J Med* 1849;1:1-18

Wong PC. Management of tuberculous pleuritis: can we do better? *Respirology* 2005;10:144-148

Wood AM, Bassford C, Webster D, Newby P, Rajesh P, Stockley RA, Thickett DR. Vitamin D-binding protein contributes to COPD by activation of alveolar macrophages. *Thorax* 2011;66:205-210

World Health Organization: The global burden of disease: 2004 update.

Wrightson JM, Stanton AE, Maskell NA, Davies RJ, Lee YC. Pseudochylothorax without pleural thickening. Time to reconsider pathogenesis? *Chest* 2009;136:1144-1147

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

Wu AC, Tantisira K, Li L, Fuhlbrigge AL, Weiss ST, Littonjua A. Effect of vitamin D and inhaled corticosteroid treatment on lung function in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:508-513

Xaubet A, Diumenjo MC, Marin A, Montserrat E, Estopá R, Llebaría C, Austí A, Rozman C. Characteristics and prognostic value of pleural effusions in non-Hodgkin's lymphomas. *Eur J Respir Dis* 1985;66:135-140

Xiao W, Hsu YP, Ishizaka A, Kirikae T, Moss RB. Sputum cathelicidin, urokinase plasminogen activation system components, and cytokines discriminate cystic fibrosis, COPD, and asthma inflammation. *Chest* 2005;128:2316-2326

Xiol X, Castellote J, Baliellas C, Ariza J, Gimenez Roca A, Guardiola J, Casais L. Spontaneous bacterial empyema in cirrhotic patients: analysis of eleven cases. *Hepatology* 1990;11:365-370

Yamaguchi N, Isomoto H, Mukae H, Ishimoto H, Ohnita K, Shikuwa S, Mizuta Y, Nakazato M, Kohno S. Concentrations of  $\alpha$ - and  $\beta$ -defensins in plasma of patient with inflammatory bowel disease. *Inflamm Res* 2009;56:192-197

Yamshchikov AV, Kurbatova EV, Kumari M, Blumberg HM, Ziegler TR, Ray SM., Tangpricha V. Vitamin D status and antimicrobial peptide cathelicidin (LL-37) concentrations in patients with active pulmonary tuberculosis. *Am J Clin Nutr* 2010;92:603-611

Yokogawa M, Kojima S, Araki K, Tomioka H, Yoshida S. Immunoglobulin E: Raised levels in sera and pleural exudates of patients with paragonomiasis. *Am J Trop Med Hyg* 1976;25:581-586

Yuk JM, Shin DM, Lee HM, Yang CS, Jin HS, Kim KK, Lee ZW, Lee SH, Kim JM, Jo EK. Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell Host Microbe* 2009;6:231-243

Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett* 1995;374:1-5

Zemlin AE, Burgess LJ, Carstens ME. The diagnostic utility of adenosine deaminase isoenzymes in tuberculous pleural effusions. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:214-220

Zhang M, Gatley MK, Wang E. Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *J Clin Invest* 1994;93:1733-1739

Zinneman HH, Johnson JJ, Lyon RH. Proteins and mucoproteins in pleural effusions. *Am Rev Tuberc Pulmon Dis* 1957;76:247-255

## **9. ANEXOS**

## 9.1 Aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria



FUNDACIÓN MARQUÉS DE VALDECILLA  
IFIMAV



M<sup>a</sup> BLANCA SÁNCHEZ SANTIAGO, Secretario/a del COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE CANTABRIA

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del Investigador Principal del estudio:

TÍTULO: **Estado nutricional en vitamina D y péptidos antibióticos vitamina D dependientes (Catelicidina y  $\beta$ -defensina 2) en sangre y en el líquido pleural: posibles implicaciones fisiopatológicas y diagnósticas en los derrames pleurales.**

TIPO DE ESTUDIO: **Proyecto de Investigación**

y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Este CEIC, emite un informe **FAVORABLE** para que dicho Estudio sea realizado en el **HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA**, actuando como investigador principal el Dr./Dra. **CARLOS ANTONIO AMADO DIAGO**.

Como queda reflejado en el Acta: **25/2012**.

Lo que firmo en Santander, a **27 de julio de 2012**

  
M<sup>a</sup> BLANCA SÁNCHEZ SANTIAGO  
Secretario/a del CEIC

Tlfno: 942 315 515 • Fax: 942 315 517 • e-mails: [ifimav.eclnicos3@fmdv.org](mailto:ifimav.eclnicos3@fmdv.org) y [ifimav.eclnicos4@fmdv.org](mailto:ifimav.eclnicos4@fmdv.org)  
• <http://www.ifimav.org> Avda. Valdecilla, s/n • 39008 SANTANDER (Cantabria)

## 9.2 Hoja de recogida de datos

Datos generales:

Orden

Fecha de nacimiento

Fecha de obtención del líquido

Género

Determinaciones específicas:

25 OH vitamina D en suero

25 OH vitamina D en líquido pleural

1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamina D en suero

1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamina D en líquido pleural

VDBP en suero

VDBP en líquido pleural

Catelicidina en suero

Catelicidina en líquido pleural

$\beta$ -2-Defensina en suero

$\beta$ -2-Defensina en líquido pleural

Datos diagnósticos:

Diagnóstico

Subgrupo etiológico

Cardiaco

Infeccioso

Complicado

No complicado

Tumoral

Desconocido

Infrecuente

EXUDADO/TRASUDADO ETIOLÓGICO

EXUDADO

TRASUDADO

EXUDADO/TRASUDADO SEGÚN CRITERIOS DE LIGHT

EXUDADO

TRASUDADO

Analítica rutinaria en líquido pleural:

Anatomía patológica:

Recuento celular (%)

Polimorfonucleares (%)

Linfocitos (%)

Eosinófilos (%)

Macrófagos (%)

Basófilos (%)

Mesoteliales (%)

Malignas

Si

No

Tipo

Microbiología

Microorganismo

Bioquímica

ADA

Proteínas

LDH

Colesterol

Triglicéridos

Amilasa

Glucosa

pH

Analítica rutinaria en Sangre:

Leucocitos

Segmentados (%)

Linfocitos (%)

Monocitos (%)

Eosinófilos (%)

Basófilos (%)

Proteínas

LDH

VSG

PCR

Procalcitonina

Calcio

Albúmina

#### Datos Evolutivos

UCI

Si

No

SUPERVIVENCIA PRIMER MES

SI

NO

SUPERVIVENCIA 6 MESES

SI

NO

MUERTE

SI

NO

Fecha de la muerte

# LL-37 is produced intrapleurally in infectious pleural effusion

CA Amado, J. Villuela, MD<sup>1</sup>, M. García-Unzueta, MD<sup>2</sup>, JJ Ruiz-Cubillan, A Daly, B Abascal, D Ferrer, Dr. F Santos, D Iturbe, and R Agüero

Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

## Introduction

LL-37 is an antimicrobial peptide produced by neutrophils, respiratory epithelial and mesothelial cells that has been studied for its broad spectrum activity against microorganisms. It also recruits inflammatory cells and promotes immune responses(1). It has never been measured in pleural fluid.

## Objectives

The objective of our Study is to measure the pleural and serum levels of LL-37 in pleural effusion, and to compare these levels and the pleural-to-serum LL-37 ratio among pleural fluids of the three most frequent etiologies: infectious, malignant and congestive heart failure (CHF).

## Methods

We obtained 42 pleural effusions (collected in our hospital from November 2010 to April 2011) and divided them into 3 diagnostic categories: The diagnosis of infectious effusion required the previous diagnosis of pneumonia by radiological and clinical criteria or empyema demonstrated by microbiological methods. Malignant effusion required that malignant tissue in the pleural cavity be shown by pleural biopsy or cytopathology. CHF effusion required transudative effusion by Light's criteria in an adequate clinical background and response to diuretics. LL-37 was measured in the pleural fluid and serum of 23 infectious effusions, 10 malignant effusions and 9 CHF effusions by ELISA (Hycult, Netherlands). Statistical analyses were performed using statistical computer software (SPSS 17.0).

## Results

All results are presented: mean +/- Std. Deviation, (median, minimum-maximum).

Pleural Fluid LL-37 levels: Infectious 3.77±4.81 ng/ml (1.64, 0.38-19.4) malignant 2.58±4.17 (0.87, 0.09-135) , CHF 1.59±1.02 (0.99, 0.47-3.3) (Kruskal Wallis test p= 0.4)

Serum LL-37 levels: Infectious 2.09±3.42 ng/ml (0.98, 0.06-16.35) malignant 3.44±4.3 (1.19, 0.17-12.6) , CHF 3.44±3.02 (2.6, 0.71-10.3) (Kruskal Wallis test p=0.13)

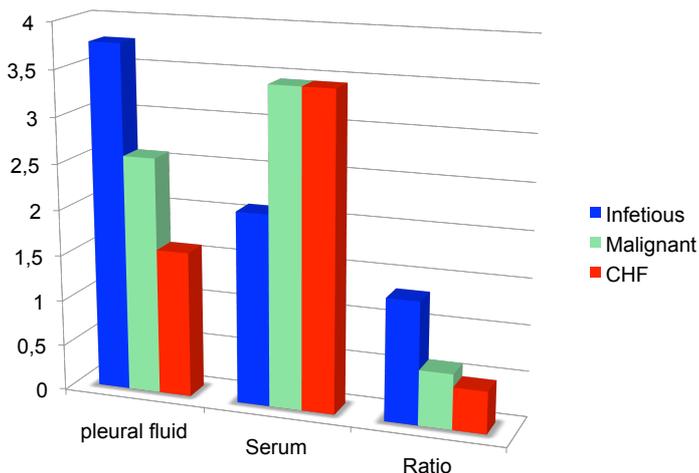
Pleural fluid-to-Serum LL-37 ratio levels: Infectious 1.33±1.88 (1.29, 100-0.43) malignant 0.60±0.92 (0.72, 1.11-0.21) , CHF 0.46±0.93 (0.44, 1.12-0.24) (Kruskal Wallis test p< 0.001. Scheffé test: Infectious vs malignant p=0.002, infectious vs CHF p<0.001, malignant vs CHF not significant.

## Conclusions

Pleural fluid-to-Serum LL-37 ratios are significantly elevated in infectious pleural effusions in comparison with malignant or CHF pleural effusions, suggesting that LL-37 is actively produced intrapleurally in infectious effusions.

## References

1.-Teclé T, Tripathi S, Hartshorn KL. Review: Defensins and cathelicidins in lung immunity.



## 9.4 Comunicación Congreso de la ERS 2013



Sunday 4 August 2013

Dear Dr. Amado,

We are pleased to inform you that your abstract entitled: "**Human beta defensin-2 serum levels are lower in complicated infectious pleural effusions**" has been selected for presentation in Oral Presentation entitled "**Interesting research questions**" at the ERS Barcelona 2013 Congress. The session will be held on **Wednesday, 11-09-2013** from **08:30 to 10:30** in "**Room 2.3**".

Read carefully the instructions on how to prepare your abstract presentation on our website :  
<http://www.erscongress2013.org/programme-what-you-get/2013-05-08-09-02-03/guidelines.html>

In order to increase the visibility of your abstract during the congress, authors of an accepted abstract will be encouraged to create an electronic version of their work, called E-Poster. A database with all E-Posters will be accessible throughout the congress at the E-Poster area onsite. A personal **password** and **login** (that will be sent to [amadodiago.carlos@gmail.com](mailto:amadodiago.carlos@gmail.com)) to access the link and create your E-Poster online will be sent to you in July as well as E-Poster creation guidelines and poster models to help you in the process. Every delegate can access the platform, consult and comment your E-Poster during the Congress. *N.B. the creation of E-Poster is recommended for all accepted abstracts.*

We would like to point out that:

1. At least one of the authors (the presenting author) must be a registered participant at the Congress. In order to register, please go to: <http://www.erscongress2013.org/home/registration.html>.
2. No change can be made to the abstracts
3. Real or perceived conflicts of interest that relate to your presentation have to be disclosed when presenting your abstract (on poster or on slide presentation) and on your E-Poster.
4. If, for any reason, you have to cancel your presentation, it is important that you notify us immediately. Please use the following contact details:
  - To cancel your abstract presentation both in the *Final Programme* and the *Abstract book*: ERS Scientific Dept. in Lausanne by fax: +41 21 213 01 00; or by e-mail: [scientific@ersnet.org](mailto:scientific@ersnet.org)
  - To cancel your registration to the Congress: KIT Group by e-mail: [ers2013registration@kit-group.org](mailto:ers2013registration@kit-group.org)

If you will not be the one presenting the abstract, we would be grateful if you could pass on the information in this letter to the person concerned.

Yours sincerely,  
ERS Scientific activities department on behalf of

Laurent-Pierre Nicod, Programme Committee Chair

**N.B. No-shows:**  
Every year, a number of authors with accepted abstracts fail to attend the Congress or to present their work.  
We wish to remind you that if you do not show up, or do not have a co-author present in your place, you may not be invited to present your work at future ERS meetings.

[www.erscongress2013.org](http://www.erscongress2013.org)

## 9.5 Comunicación Congreso SEPAR 2012



# ESTADO NUTRICIONAL EN VITAMINA D EN LOS PACIENTES CON DERRAME PLEURAL

C.A. Amado, J. Villuela, D. Ferrer, J.J. Ruiz-Cubillán, A. Daly, B. Abascal, M. Ortiz, M.T. García-Unzueta

Servicios de Neumología y Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. IFIMAV. Santander

### INTRODUCCIÓN

La identificación de receptores para el metabolito activo de la vitamina D (Calcitriol) en numerosas células ha venido a sugerir a existencia de nuevas funciones de esta vitamina, más allá del metabolismo fosfocálcico (respuesta inmunológica, respuesta frente al cáncer, actividad muscular, función cardiovascular, etc...) (1).

El estado nutricional en Vitamina D, de acuerdo con los criterios del Institute of Medicine USA de Noviembre de 2010, se considera adecuado cuando los niveles séricos de 25 OH vitamina D (25 OHD), el metabolito estable de la vitamina D, son superiores a 20 ng/ml, deficiencia si los niveles se encuentran entre 20 y 10 ng/ml, y deficiencia grave si los niveles son inferiores a 10 ng/ml.

En la actualidad se sabe que la hipovitaminosis D es frecuente en nuestra población.

El objetivo de este estudio es valorar el estado nutricional en vitamina D en un grupo de pacientes con derrame pleural de distinta etiología.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 43 casos de derrame pleural entre octubre de 2010 y abril de 2011, en los que se obtuvo una muestra simultánea de sangre para las determinaciones bioquímicas rutinarias y 25 OHD, tras obtener consentimiento informado de los pacientes. Los derrames pleurales fueron clasificados en los siguientes grupos, siguiendo criterios aceptados en la literatura (2): 1) Infeccioso (cuando los pacientes presentaban una condensación acompañando el derrame, cuando presentaban un cultivo positivo en esputo o líquido pleural para un microorganismo, o cuando la anatomía patológica era sugestiva de infección. En el caso de los derrames de etiología tuberculosa, se incluyeron además dos casos por cumplir criterios clínicos junto con ADA alto, y Mantoux positivo, 2) Maligno (cuando el derrame presentaba citología o biopsia positiva para células malignas) 3) Cardíaco (cuando el derrame era un trasudado según los criterios de Light y el paciente presentaba datos clínicos de insuficiencia cardíaca). No se incluyeron casos dudosos o de posibles etiologías mixtas o raras.

Ninguno de ellos recibía fármacos o tenía enfermedades que pudieran alterar los niveles séricos de 25OHD

Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (mediana, rango)

De los 43 casos 22 eran de causa infecciosa (14 hombres y 8 mujeres) con una edad de  $60 \pm 23$  años (57, 12-96), 13 eran de causa tumoral, 8 hombres y 5 mujeres, edad  $69 \pm 14$  (75, 40-87), 8 cardíacos, 4 hombres y 4 mujeres edad  $75 \pm 19$  (82, 31-89).

La determinación de 25 OHD se realizó mediante enlace competitivo utilizando quimioluminiscencia automatizada (IDS).

Los datos fueron analizados mediante el sistema informático SPSS versión 17.0

### RESULTADOS

Los niveles de 25 OHD en suero en los pacientes con causa infecciosa fueron:  $14,4 \pm 8,2$  ng/ml (13,4, 3-34,3), en los pacientes de etiología cancerosa  $16,3 \pm 5,7$  (14,2, 9,3-24,5), y en el grupo de etiología cardíaca  $13,0 \pm 8,2$  (10,7, 5,4-30,5). No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos.

De los 22 pacientes de causa infecciosa, sólo 4 presentaban niveles adecuados de 25 OHD (18%), de los 13 tumorales, sólo 5 tenían niveles adecuados de 25 OHD (38%), y de los cardíacos sólo 1 tenía niveles adecuados de 25 OHD (12,5%).

De los 22 pacientes de etiología infecciosa 8 presentaban una deficiencia grave de vitamina D (36%), de los 13 tumorales, 1 presentaba deficiencia grave (7%), y de los 8 cardíacos 4 tenían deficiencia grave (50%).

### CONCLUSIONES

La hipovitaminosis D es muy frecuente en los pacientes con derrame pleural, cualquiera que sea su causa.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de vitamina D de los pacientes con derrame pleural de distinta etiología.

La causa de este déficit es probablemente multifactorial (ingesta dietética pobre en vitamina D, insuficiente exposición solar e hiperconsumo de esta vitamina).

### REFERENCIAS

1.-Di Rosa M, Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Vitamin D3: a helpful immunomodulator. *Immunology*. 2011, 134:123-39.

2.-Maskell N et al; British Thoracic Society Pleural Disease Guideline Group. *Thorax*. 2011;65:667-9.

## 9.6 Comunicación congreso SEPAR 2013



### CATELICIDINA EN DERRAME PLEURAL DE DISTINTO TIPO

CA Amado, J. Villuela, MD<sup>1</sup>, MT. García-Unzueta, JJ Ruiz-Cubillan, D Ferrer, F Santos, Cristina Ciorba, Victor Mora  
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla



#### Introducción

La catelicidina es un péptido antimicrobiano derivado de la vitamina D que juega un papel importante en la inflamación (1). Nunca se ha estudiado su relación con las distintas etiologías de derrame pleural.

#### Material y Métodos

Se estudiaron 102 muestras de líquido pleural y de suero de los pacientes con derrame pleural diagnosticados en nuestro hospital de Noviembre de 2010 a Noviembre de 2011. De los 102 casos fueron excluidos 19 por tratarse de derrames de etiología desconocida (8) y 11 por tratarse de causas raras u obvias (la mayoría derrames en postoperados no infectados). Los restantes 82 casos fueron divididos en subgrupos en función de su diagnóstico en infeccioso, tumoral o de etiología cardíaca. También se les clasificó en función de su diagnóstico entre trasudados y exudados. Dentro de los infecciosos se subdividieron los derrames pleurales en complicados y no complicados utilizando como criterio si precisaron colocación o no de tubo de tórax. De los 82 casos, infeccioso 30 (36,5%), tumoral 26 (31,7%), cardíaco 26 (31,7%). De los 30 infecciosos 18 (60%) fueron derrames no complicados y 12 (40%) complicados. 56 (68%) exudados y 26 (31,7%) trasudados según criterios clínicos. En las muestras de suero y líquido pleural se analizaron los niveles de catelicidina y se calculó el cociente de los niveles entre líquido pleural y suero. Los datos fueron analizados mediante el sistema informático SPSS versión 17.0, se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (mediana, rango).

#### Resultados

	PLEURA	PLEURA/SUERO	SUERO
TRASUDADO	0,9+/- 1,05; (0,5 0,01-3,3)	3,31+/- 9,81; (1, 0,21-72,83)	(1,06 0,01-10,34)
EXUDADO	2,29+/- 3,84; (0,93 0,01-19,4)	0,97+/- 1,52; (0,44 0,11-6,6)	1,78+/- 3,18; (0,85 0,01-16,35)
CARDIACO	0,68+/- 0,91; (0,28 0,1-3,3)	0,88+/- 1,23; (0,66 0,11-6,6)	1,48+/- 2,33; (0,43 0,01-10,34)
TUMORAL	1,75+/- 2,95; (0,87 0,01-13,5)	1,12+/- 1,02; (0,9 0,21-5,10)	2,13+/- 3,46; (0,85 0,01-12,62)
INFECCIOSO	3,15+/- 4,46; (1,4 0,053-19,4)	5,47+/- 13,35; (1,23 0,43-72,83)	1,77+/- 3,07; (0,91 0,01-16,35),
NO COMPLICADO	1,66+/- 1,98; (0,82 0,53-7,06)	2,5+/- 3,37; (1, 0,43-13,94)	0,9+/- 1,05; (0,5 0,01-3,3)
COMPLICADO	5,39+/- 6,11; (2,99 0,191-19,4)	,93+/- 20,41; (2,52 0,89-72,83)	0,9+/- 1,05; (0,5 0,01-3,3)

	PLEURA	PLEURA/SUERO	SUERO
TRASUDADO/EXUDADO	p= 0,141	p= 0,018	p = 0,315
ETIOLÓGICO	p= 0,001	p= 0,000	p = 0,51
COMPLICADO	p= 0,010	p= 0,051	p= 0,124

#### Conclusiones

La catelicidina se produce en la pleura ante estímulos inflamatorios.  
Cuanto mayor es el estímulo inflamatorio, mayor es la producción de catelicidina en la pleura.  
Esto no se cumple en los niveles en suero de esta sustancia.

1.-Teclé T, Tripathi S, Hartshorn KL. Review: Defensins and cathelicidins in lung immunity.

## 9.7 Comunicación Congreso SEPAR 2013



### CORRELACIONES DE CATELICIDINA CON DISTINTOS MARCADORES EN PLEURA. CA

Amado, J. Villuela, MD<sup>1</sup>, MT. Garcia-Unzueta, JJ Ruiz-Cubillan, D Ferrer, F Santos, Milagros Ruiz, Maria Ortiz

Hospital Universitario Marqués de Valdecilla



### Introducción

La catelicidina es un péptido antimicrobiano derivado de la vitamina D que juega un papel importante en la inflamación (1) Nunca se ha estudiado su relación con distintos marcadores que se pueden medir en el líquido pleural.

### Material y Métodos

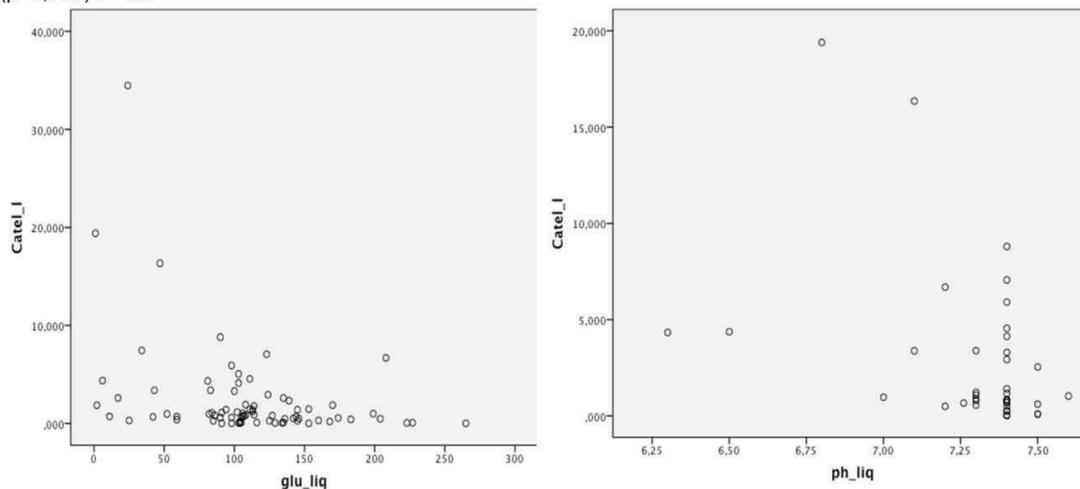
Se estudiaron 102 muestras de líquido pleural de los pacientes con derrame pleural diagnosticados en nuestro hospital de Noviembre de 2010 a noviembre de 2011. De los 102 casos, 9 (8,82%) se trataban de derrames de etiología desconocida, 11(10,78%) se trataban de derrames de etiología poco frecuente, causas raras u obvias (la mayoría derrames en postoperados no infectados).

infeccioso 30 (29,4%), tumoral 26 (25,48%), cardiaco 26 (25,48%).

En las muestras de líquido pleural se analizaron los niveles de catelicidina se estudió su correlación con los niveles en suero de Vitamina D (midiendo su metabolito 25OH-Vitamina D) y con glucosa, pH, proteínas totales y LDH en líquido pleural utilizando la técnica Rho de Spearman. Los datos fueron analizados mediante el sistema informático SPSS versión 17.0, se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (mediana, rango).

### Resultados

Correlación con Vitamina D en suero de 0,107 ( $p=0,305$ )  $n=102$ , correlación con glucosa pleural de  $-0,361$  ( $p=0,001$ )  $n=77$ , correlación con pH pleural de  $-0,366$  ( $p=0,022$ )  $n=39$ , correlación con proteínas totales pleurales de  $0,170$  ( $p=0,132$ )  $n=80$ , correlación con LDH pleural de  $0,162$  ( $p=0,138$ )  $n=85$ , correlación con ADA en pleura de  $-0,050$  ( $p=0,655$ )  $n=82$ .



### Conclusiones

Existe una correlación negativa débil, estadísticamente significativa entre los niveles de catelicidina en líquido pleural y el pH y glucosa en líquido pleural.

No se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre los niveles de catelicidina en líquido pleural y niveles de vitamina D en suero, los niveles de proteínas totales o los de LDH.

De estos resultados se puede deducir que la catelicidina se puede producir en la pleura ante estímulos inflamatorios.

1.-Teclé T, Tripathi S, Hartshorn KL. Review: Defensins and cathelicidins in lung immunity.

## 9.8 Comunicación Congreso SEPAR 2014



### Déficit de vitamina D en los derrames infecciosos: estudio con controles sanos.

CA Amado, J. Villuela, MT. García-Unzueta, M. Ruiz, M Ortiz, D Ferrer, F Santos, C. Fariñas  
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla



### Introducción

La identificación de receptores para el metabolito activo de la vitamina D (Calcitriol) en numerosas células ha servido para demostrar la existencia de nuevas funciones de esta vitamina, más allá del metabolismo fosfocálcico (respuesta inmunológica, respuesta frente al cáncer, actividad muscular, función cardiovascular, etc...). El estado nutricional en Vitamina D, de acuerdo con los criterios del Institute of Medicine USA de Noviembre de 2010, se considera adecuado cuando los niveles séricos de 25 OH vitamina D (25 OHD), el metabolito estable de la vitamina D, son superiores a 20 ng/ml, déficit si los niveles se encuentran entre 20 y 10 ng/ml, y déficit severo si los niveles son inferiores a 10 ng/ml. En la actualidad se sabe que la hipovitaminosis D es bastante frecuente en nuestra población, especialmente en los ancianos. El objetivo de este estudio es valorar el estado nutricional en vitamina D entre los pacientes que tienen un derrame pleural infeccioso y compararlo con un grupo de pacientes control sanos.

### Material y Métodos

Se estudiaron 33 casos de derrame pleural infeccioso entre octubre de 2010 y abril de 2011, en los que se obtuvo una muestra de suero para las determinaciones bioquímicas rutinarias y 25 OHD. Simultáneamente se sacaron muestras de 33 voluntarios sanos que actuaron como grupo control. Los controles fueron apareados con los casos por su edad. La edad media de ambos grupos fue de 57+/-16 años. En el grupo con derrame pleural 22 (66%) eran hombres, en el grupo control, 8 (24%) eran hombres. La determinación de 25 OHD se realizó mediante enlace competitivo utilizando quimioluminiscencia automatizada (IDS). Los datos fueron analizados mediante el sistema informático SPSS versión 20.0

### Resultados

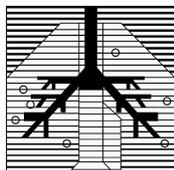
Parámetro	Derrame Infeccioso	Control	p
Número	33	33	NA
Edad media (años)	57±16	57±16	NA
Sexo Masculino n(%)	22(66)	8(24)	0,002
25OH Vitamina D ng/ml	17,81±8,14	25,87±10,11	0,001
Déficit n(%)	19(57,6%)	9(27%)	0,003
Déficit Severo	4(12,1%)	0(0%)	0,007

### Conclusiones

Los pacientes con derrame pleural de etiología infecciosa, tienen un déficit importante de vitamina D en comparación con el grupo control. Existe un número aumentado de pacientes con déficit de cualquier tipo y de déficit severo en el grupo de pacientes con derrame pleural infeccioso de forma estadísticamente significativa.

Bibliografía: -Teclé T, Tripathi S, Hartshorn KL. Review: Defensins and cathelicidins in lung immunity.

## 9.9 Comunicación congreso SOCALPAR 2013



**SOCIEDAD CASTELLANO-LEONESA Y CÁNTABRA  
DE PATOLOGÍA RESPIRATORIA –SOCALPAR–**



D. Juan Ortiz de Saracho y Bobo, Secretario de SOCALPAR  
Sociedad Castellano Leonesa y Cántabra de Patología Respiratoria y  
PRESIDENTE DEL COMITÉ ORGANIZADOR

CERTIFICO que:

Carlos A. Amado, Javier Villuela, Diego Ferrer, Juan José Ruiz Cubillán,  
Víctor Mora, Cristina Ciorba, Francisca Santos, Mayte García Unzueta.

han participado en la comunicación presentada en el XXXII  
CONGRESO DE LA SOCALPAR CELEBRADO EN PONFERRADA LOS DÍAS  
10 Y 11 DE MAYO 2013.

### **“Niveles de Vitamina D en el Derrame Pleural Complicado”**

Para que conste y surta los efectos oportunos, se firma en  
Ponferrada a diez de Mayo de dos mil trece.

Fdo.: D. Juan Ortiz de Saracho  
Secretario de SOCALPAR

