



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**Análisis de intermediarios metabólicos en líquido pleural
de pacientes con cáncer pulmonar**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

JOSÉ ANTONIO GUZMÁN NAVA

TUTOR PRINCIPAL

**DRA. AÍDA SUSANA ROMERO GARCÍA (PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL)**

COMITÉ TUTORAL

**DRA. SAMANTA ESTHER ROMERO SILVA (PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTO-
RADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL)**

**DR. HERIBERTO PRADO GARCÍA (PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL)**

MÉXICO D.F

ENERO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mis padres Maria Esther Nava Pérez y Magdaleno Guzmán Yañez, quienes creen en mí, me apoyaron, y son parte de la razón para seguir adelante, porque gracias a sus consejos, correctivos, honores y sobre todo el amor que me dan, ya que gracias a ustedes soy la persona que soy.

MAM y DADDY los amo!

A mis grandiosas hermanas Alejandra y Magdalena quienes me han apoyado en todo momento, por sus largas platicas por la confianza que depositan en mí y porque aquí estaré para apoyarlas en todos momentos.

A mis hermanos Rodolfo, Marcos y Ricardo que me ha permitido ser parte importante de momentos en su vida los cuales aprecio tanto.

A mis sobrinos, Mari y Danis los extraño tanto, Karen, Karla, Tish y Josefo con quienes los momentos en la vida siguen sintiéndose, Tomas, Diana y Betillo que hacen mirar hacia arriba, Mariana y Frida que son las princesas de la familia, mis nietos; Demian, Marquez y a Brian quien es la tuerca que se me ha perdido, Nadia, Chave, que la tecnología me acerca más a ellas. Y quienes están por llegar.

A mis amigos, Alex y Teo que hicieron más ameno el camino que sigo recorriendo, por sus consejos sus invitaciones, por su tiempo pero sobre todo por su incondicional amistad.

A mis amigas Jaz, Rosita, Mago, Tamara y Chio que a pesar de la lejanía seguimos frecuentándonos.

A Eduardo Vargas Zúñiga que es parte de la vida y de los momentos que comienzan y espero que jamás terminen.

A la familia Aranda Rosas, y Vargas Zuñiga por hacerme parte de su familia.

Aceptar nuestra vulnerabilidad en lugar de tratar de ocultarla es la mejor manera de adaptarse a la realidad "*Viscott, David* "

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Autónoma de México por brindarme la oportunidad de formarme académicamente dentro de sus aulas.

Al Dr. Sullivan, que me apoyo y cree en mí, además de ser un gran amigo, porque gracias a su tiempo, dedicación y ayuda, mi vida mejora a cada momento.

A la Dra. Samanta, por sus conocimientos para este proyecto, su apoyo incondicional en los momentos más difíciles emocionalmente y sobre todo por su amistad.

A la Dra. Susana García Romero por aceptarme en su proyecto, por el apoyo, su paciencia y comprensión para con migo.

Al Dr. Heriberto Prado García, por su apoyo para la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Ángeles, por los conocimientos e ideas compartidas para este proyecto.

A la M. en C. Verónica Rojo, quien fue mi vecina y apoyo en todo momento por sus conocimientos compartidos, por su tiempo dedicado.

A el M. en C. Lorenzo Islas, por sus conocimientos compartidos y comentarios.

A la QFB. Alama Delia, o Salma de las mitocondrias (Alma), quien hizo de los primeros meses en el laboratorio hacerme sentir muy bien.

A la QFB Jimena Orozco, quien con su delicada pero sincera sonrisa contagiaba de alegría.

Al QFB Christian Parache, que contagia con su valentía en todo momento.

Al QFB Rodolfo, que hace de los buenos momentos, mejores momentos.

A Joel, animoso compañero.

A mis amigos de la maestría Jacqueline, Raquel, Laura, y Pedro que hicieron más placentera la estancia en las clases.

A todos ustedes gracias por su amistad y porque sé que contaré con ustedes siempre.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. CÁNCER.....	1
1.2 Cáncer de Pulmón	1
1.3. Epidemiología.....	2
1.4 Cáncer de células pequeñas.....	2
1.5 Cáncer de células no pequeñas.....	3
2. Pleura.....	4
2.1. Derrame pleural.....	5
2.2 Tipos de derrame pleural.....	6
2.2.1. Derrames pleurales infecciosos.....	8
2.2.2. Derrames pleurales malignos.....	8
2.2.3. Derrames pleurales inflamatorios no infecciosos.....	8
2.2.4 Otras causas de derrames pleurales.....	9
3. Drenaje de líquido pleural.....	9
3.1 Toracocentesis	9
3.2 Análisis bioquímico del líquido pleural.....	10
4. ANTECEDENTES	12
4.1 Glucosa.....	12
4.2 Glucosa Pleural.....	12
4.3 Lactato.....	13
4.4 Lactato Pleural.....	14
4.5 Acidosis pleural.....	15
4.6 Ácido Acético.....	16
4.7 Glutamina.....	16
4.8 Glutamato.....	17
5 Justificación.....	19
6. Hipótesis.....	20
7. Objetivo.....	21

7.1 Objetivo particular.	21
8. MATERIALES Y MÉTODOS.	22
8.1 Recolección de muestras.	22
8.2 Población de estudio.	22
8.3 Estrategia Experimental.	23
8.4 Medición de los metabolitos glucosa, lactato, glutamina y glutamato por medio del analizador bioquímico YSI.	24
8.5 Medición de ácido acético por UV.	26
8.6 Análisis estadístico.	26
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	27
9.1 Determinación de los niveles de glucosa lactato, glutamina y glutamato en los diferentes grupos estudiados.	27
9.2 Determinación de los parámetros diagnósticos asociados a adenocarcinoma utilizando como marcadores los metabolitos: glucosa, lactato, glutamina, glutamato y ácido acético en los diferentes grupos estudiados.	37
10. CONCLUSIONES.	39
11. BIBLIOGRAFÍA.	40
12. Apéndice 1.	44

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla I. Componentes del líquido pleural	4
Tabla II. Mecanismos por los cuales se origina un derrame pleural.....	6
Tabla III. Principales causas de los derrames pleurales trasudativos y exudativos	7
Tabla IV. Diagnóstico y pruebas indicadas en función del aspecto del líquido pleural....	11
Tabla V. Población de estudio	23
Tabla VI. Niveles de los distintos metabolitos en el líquido pleural de los diferentes grupos estudiados.	31
Tabla VII. Correlación entre las concentraciones de glucosa, lactato, glutamina, glutamato y ácido acético en líquido pleural de pacientes con tuberculosis.....	32
Tabla VIII. Correlación entre las concentraciones de glucosa, lactato, glutamina, glutamato y ácido acético en líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma.....	32
Tabla IX. Valores de corte y parámetros diagnóstico en líquido pleural	35
Figura 1. Estrategía experimental.....	23
Figura 2. Esquema del procesamiento de los líquidos pleurales	24
Figura 3. Componentes de la membrana del analizador bioquímico YSI	25
Figura 4. Distribución de la concentración de glucosa en líquido pleural	27
Figura 5. Distribución de la concentración de lactato en líquido pleural	28
Figura 6. Distribución de la concentración de glutamina en líquido pleural	29
Figura 7. Distribución de la concentración de glutamato en líquido pleural.....	30
Figura 8. Correlación glucosa-lactato en adenocarcinoma (A) y tuberculosis (B).....	33
Figura 8. Correlación glutamina-glutamato en adenocarcinoma (C) y tuberculosis (D). 33	
Figura 9. Correlación glucosa-glutamina (E) y lactato-glutamato (F) en tuberculosis....	35
Figura 10. Distribución de la concentración de ácido acético en líquido pleural.....	36

RESUMEN

En México, las enfermedades cardiovasculares ocupan la primera causa de muerte seguidas por los tumores malignos. Dentro de éstos, los tumores malignos de órganos respiratorios e intratorácicos ocupan un lugar importante. En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), el cáncer de pulmón constituye la cuarta causa de consulta y de hospitalización, el cual frecuentemente presenta derrame pleural. Sin embargo, existen varias patologías pulmonares que también desarrollan derrame pleural y el diagnóstico certero requiere de tiempo, hospitalización y en algunos casos riesgo para el paciente. El drenado del líquido pleural usualmente se lleva a cabo como parte del tratamiento y para aliviar la sintomatología del paciente. Tratando de apoyar al clínico en el camino hacia el establecimiento del diagnóstico definitivo, pensamos en probar la posibilidad de que las diferentes patologías que desarrollan derrame pleural presentan un perfil metabólico diferente debido a que tienen una etiología diferente y que el análisis en este fluido biológico revelaría el perfil metabólico característico para cada patología, en particular para diferenciar entre adenocarcinoma y tuberculosis. Después de evaluar la concentración de los metabolitos glucosa, lactato, glutamina, glutamato y ácido acético en 133 derrames pleurales de origen maligno y 38 de origen no maligno, encontramos que los grupos de adenocarcinoma y tuberculosis presentaron diferencias significativas en los metabolitos de glucosa, lactato, glutamato y ácido acético. Por medio del análisis de las curvas ROC pudimos definir los valores de corte y calcular los parámetros diagnósticos asociados a adenocarcinoma, encontrando que los metabolitos estudiados podrían apoyar en el hallazgo del diagnóstico para adenocarcinoma o tuberculosis.

ABSTRACT

In Mexico , cardiovascular diseases are the leading cause of death followed by malignant tumors. Among these , malignant tumors of respiratory organs respirtarios and intrathoraXic organs occupy an important place . At the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) , lung cancer contitutes, the fourth cause of consultation and hospitalization. This cancer often presents pleural effusion. However , there are several lung diseases THAT also develop pleural effusion and accurate diagnosis requires time, and in some cases hospitalization riskS to the patient . The drainage of pleural fluid is usually carried out as part of treatment and to relieve the patient's symptoms . In trying to support the clinician On the road to a definitive diagnosis , we propose as a working hypothesis the possibility that the different pathologies that develop pleural effusion have a different metabolic profile since they have a different etiology and that this biological fluid analysis may reveal different metabolic profile characteristicS for each pathology , in particular to differentiate between tuberculosis and adenocarcinoma. After evaluating the concentration of metabolites glucose , lactate , glutamine , glutamate and acetic acid in 133 pleural malignant effusions and 38 of nonmalignant origin , we found that adenocarcinoma and tuberculosis groups showed significant differences in metabolites of glucose, lactate , acetic acid and glutamate . Through analysis of ROC curves we could define cutoff values and calculate diagnostic parameters associated with adenocarcinoma , finding the metabolites studied could assist in the discovery and diagnostic of tuberbulosis and adenocarcinoma.

ABREVIATURAS

AcCoA	Acetil Coenzima A
AD	Adenocarcinoma
ADA	Adenosina Desaminasa
ATP	Adenosín trifosfato
BAAR	Bacilo Ácido Alcohol Resistente
CPCP	Carcinoma de Pulmón de Células Pequeñas
CS	Citrato Sintetasa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Derrame Pleural
DPM	Derrame Pleural Maligno
DPM-C	Derrame Pleural Maligno de estirpe epitelial/carcinoma
DPP	Derrame Pleural Paraneumónico
GLUT-1	Transportador de Glucosa 1
H ₂ CO ₃	Ácido Carbónico
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
KOH	Hidróxido de potasio
K-ras	GTPasa KRas
LDH	Lactato Deshidrogenasa
L-MDH	L-malato deshidrogenasa
LP	Líquido Pleural
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógeno
MCT4	Transportador de Monocarboxilato
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NSCLC	Carcinoma de Pulmón de Células No Pequeñas
PCR	Reacción de cadena de la Polimerasa
ROC	Curva característica del operador-receptor
SNC	Sistema Nervioso Central
TB	Tuberculosis
VPN	Valor Predictivo Negativo
VPP	Valor Predictivo Positivo

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER

El cáncer comprende una variedad de enfermedades genéticas. Las alteraciones genéticas, modifican los oncogenes, genes supresores de tumor y los genes estabilizadores implicados en el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular (como por ejemplo: bcl-2, 1-myc, GST, p53) (Shamsul, 2001; Frenzel, 2010). Las células tumorales presentan las siguientes características: evasión de la apoptosis, autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión de tejidos y metástasis, reprogramación metabólica y evasión de la respuesta inmune (Kinasewitz 1998, Formentini 2010, Galluzzi y cols.2010, Hanahan 2011).

1.2 Cáncer de Pulmón

EL cáncer de pulmón es una de las enfermedades más comunes caracterizada por el crecimiento descontrolado de células neoplásicas en uno o ambos pulmones (Warth, Muley et al. 2012). Aunque el cáncer de pulmón se puede dividir en muchos subtipos, históricamente, la distinción más importante es entre el carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC) y el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Esta situación es debido a las importantes diferencias clínicas en la presentación, la diseminación metastásica, y la respuesta a la terapia (Travis, 2011).

1.3 Epidemiología

En México, la situación respecto al cáncer es similar a la del resto de los países industrializados, la tasa nacional es de seis casos por cada 100,000 habitantes (Carla, 2009). Entre los años 2000 a 2010, de acuerdo a datos del INEGI, fallecieron por cáncer en el país un total de 726,554 personas. Representando una mortalidad del 50.6% en hombres y del 23.5% en mujeres, convirtiendo al cáncer de pulmón en la principal causa de muerte en fumadores. En el año 2010 fallecieron un total de 592,018 personas en el país, de las cuales 74,685 fueron por cáncer de pulmón, lo que equivale al 12.6%. El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer con mayor índice de mortalidad en hombres. Al hábito del consumo del tabaco se le atribuyen el 80% de los casos de cáncer de pulmón, ya que están claramente asociados (Ruíz-Godoy, 2007; Carla, 2009; Aldaco, 2012). A pesar de su alta incidencia y mortalidad, el cáncer de pulmón se detecta en la mayoría de los casos, en las últimas etapas de la enfermedad, por lo que sería de gran importancia contar con pruebas diagnósticas que fueran capaces de detectar la enfermedad en etapas muy tempranas.

1.4 Cáncer de pulmón de células pequeñas

El cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) se origina a partir de precursores de células neuroendocrinas y se caracteriza por su rápido crecimiento, alta tasa de respuesta a la quimioterapia, y radioterapia así como el desarrollo de resistencia al tratamiento (Rodríguez, 2010; Früh, 2013). Es el tumor más agresivo entre los cánceres de pulmón, sobre todo en etapas avanzadas con una tasa media de supervivencia de 10 a 12 meses en pacientes tratados con radioterapia y quimioterapia estándar (Lekic, 2012). Tiende a crecer y diseminarse rápidamente y puede causar síntomas más pronto que el cáncer pulmonar de células no pequeñas. Generalmente se presenta en la zona central del pulmón y con compromiso ganglionar mediastínico extenso.

1.5 Cáncer pulmonar de células no pequeñas

La Asociación Internacional y General del Estudio de Cáncer de Pulmón (General International Association for the Study of Lung Cancer), la Sociedad Americana Torácica (American Thoracic Society) y la Sociedad Respiratoria Europea (European Respiratory Society), clasifican el cáncer de células no pequeñas en 3 principales grupos:

- 1) Carcinoma de células escamosas (25% de los cánceres de pulmón): está vinculado con el tabaquismo. En los últimos años ha disminuido la incidencia de carcinoma epidermoide de pulmón. Menos de la mitad hacen metástasis fuera del tórax, por lo que puede considerarse el menos agresivo de los cánceres pulmonares.
- 2) Carcinoma de células grandes (10% de los cánceres de pulmón): se define como un tumor epitelial maligno con núcleos grandes, nucléolos prominentes, y por lo general bordes de las células se encuentran bien definidas. No muestran rasgos característicos de carcinoma de células escamosas, de células pequeñas o adenocarcinoma. La velocidad de crecimiento es relativamente lenta (Chang, 2006; Travis, 2011).
- 3) Adenocarcinoma (40% de los cánceres de pulmón): es el subtipo histológico más común en muchos países, y su clasificación es importante. De acuerdo a su patrón bronquioloalveolar acinar, papilar y adenocarcinoma sólido con formación de mucina. Suele provocar metástasis frecuentemente. Uno de los mayores problemas con los adenocarcinomas de pulmón es la heterogeneidad histológica. De hecho, mezclas de subtipos histológicos de adenocarcinoma son tumores que inducen derrame pleural.

2. Pleura

La pleura es la membrana serosa que recubre a los pulmones y las estructuras anatómicas que lo rodean y están destinadas a facilitar el movimiento de los pulmones. Limitan lateralmente en el tórax las llamadas “regiones pleuropulmonares”, ubicadas a ambos lados del mediastino. Clásicamente se establece la distinción entre pleura parietal y pleura visceral, pero en realidad se trata de una membrana continua, y la transición entre ambas pleuras se encuentra en el hilio pulmonar. En condiciones fisiológicas existe una fina capa de líquido pleural entre ambas pleuras el cual es un ultrafiltrado del plasma, resultado de la filtración y reabsorción pleural. El volumen aproximado en cada hemitórax es de 0.3 ± 0.06 ml/kg de peso corporal y la tasa de producción y reabsorción es de unos pocos mililitros al día. La acumulación de líquido en este espacio se denomina derrame pleural. En condiciones normales la composición del líquido pleural (Kinasewitz, 1998; Mayse, 2008). Y la comparación con una condición de malignidad neoplásica se detalla en la Tabla I.

Tabla I. Componentes del líquido pleural	
Composición del líquido pleural no maligno	Composición del derrame pleural maligno
Volumen: 0.1 ± 0.6 ml/kg	Variable
Células/mm ³ : 1,000-5,000	1500- 5000
Células mesoteliales: 3-70%	50- 70%
Macrófagos: 30-75%	50-70%
Linfocitos: 2-30%	50-70%
Relación: CD4/CD8 0.6-1	1.5-2.9
Proteínas: 1-2g/dL	1.5-8g/dL
Albumina: 50-70%	
Glucosa Similar al plasma	>60mg/dL
LDH >600 IU/L	< 600IU/L
pH \geq plasma	<7.3 en un rango de 6.95-7.29

2.1. Derrame pleural

El derrame pleural se define como la acumulación anormal de líquido en la cavidad pleural; no es una enfermedad, es el resultado del desequilibrio entre la formación y la reabsorción de líquido. En la mayoría de los casos es secundaria a una enfermedad pleural o pulmonar, pero puede ser causado por enfermedades extra pulmonares (cardíacas, hepáticas, renales, pancreáticas, sistémicas y neoplasias). Ocasionalmente, el derrame pleural puede ser la primera manifestación de enfermedad tumoral, como sucede en un 5% de los pacientes con cáncer bronquial. En alrededor del 6% de los derrames pleurales neoplásicos no se logra identificar el tumor primario. El 75% de los derrames pleurales neoplásicos son secundarios a cáncer pulmonar, cáncer mamario y linfomas. Se estima que alrededor de un 50% de los pacientes con cáncer bronquial y de 40 a 50% de las pacientes con cáncer de mama diseminado presentan derrame pleural en el curso de su evolución (Kinasewitz, 1998; Ozcakar, 2010).

El líquido pleural se origina en los capilares pleurales (principalmente parietales), el espacio intersticial pulmonar, los linfáticos o los vasos sanguíneos intratorácicos, o la cavidad peritoneal. Su reabsorción se realiza principalmente mediante los vasos linfáticos de la pleura parietal. Los mecanismos por los que se origina el derrame pleural, que se muestran en la Tabla II, se relacionan con el aumento de producción del líquido pleural o disminución de su reabsorción, y pueden estar relacionados con cambios en las presiones hidrostáticas capilares, coloidosmóticas intra o extravasculares y presiones negativas intratorácicas (Porcel-Pérez, 2002).

Tabla II. Mecanismos por los cuales se origina el derrame pleural

Aumento en la formación de líquido pleural.
Aumento del líquido intersticial pulmonar (Insuficiencia cardíaca, neumonía, embolia pulmonar).
Aumento de la presión intravascular en la pleura (Insuficiencia cardíaca, obstrucción venosa).
Aumento de permeabilidad de capilares pleurales (neumonía, neoplasia).
Disminución de la presión oncótica sanguínea (hipoalbuminemia).
Disminución de la presión pleural (atelectasia).
Aumento de líquido en la cavidad peritoneal (hidrotórax hepático).
Rotura del conducto torácico (quilotórax).
Rotura de vasos sanguíneos (hemotórax).
Disminución de la absorción de líquido pleural.
Obstrucción de vasos linfáticos que drenan la pleura parietal (neoplasia).
Aumento de las presiones vasculares sistémicas (Insuficiencia cardíaca, obstrucción venosa).

2.2 Tipos de derrame pleural.

Los derrames pleurales son clasificados en exudados aquellos que se originan los cuales pueden desarrollarse como consecuencia de procesos inflamatorios intrapulmonares Tabla III, enfermedades malignas, enfermedades de la propia pleura o de otros órganos, enfermedades abdominales, etc. Y en trasudados cuando la anormalidad primaria, en la mayoría de los casos, son secundarios a pulmón y suelen ser el corazón, hígado o riñones. La importancia de esta clasificación es simplificar el proceso para auxiliar en el diagnóstico y así determinar si es necesario realizar pruebas adicionales. Un derrame pleural tipo trasudado usualmente es bilateral y ocurre cuando el balance de las fuerzas hidrostáticas son alteradas a favor de la acumulación de líquido pleural. La permeabilidad de los capilares a las proteínas es normal. Un derrame pleural exudativo es con mayor frecuencia unilateral

y se desarrolla cuando la superficie de la pleura y/o la permeabilidad capilar local están alteradas, (Tabla III) (Kinasewitz, 1998).

Tabla III. Principales causas de los derrames pleurales trasudativos y exudativos.		
Derrame pleural tipo trasudado	Causas frecuentes	<ul style="list-style-type: none"> • Falla ventricular izquierda • Cirrosis hepática • Hipoalbuminemia • Diálisis peritoneal
	Causas menos frecuentes	<ul style="list-style-type: none"> • Hipotiroidismo • Síndrome nefrótico • Estenosis mitral • Tromboembolismo pulmonar
Derrame pleural tipo exudativo	Causas frecuentes	<ul style="list-style-type: none"> • Malignidad • Derrame paraneumónico • Tuberculosis
	Causas menos frecuentes	<ul style="list-style-type: none"> • Infarto pulmonar • Artritis reumatoide • Enfermedades autoinmunes • Pancreatitis • Síndrome pos- infarto agudo de miocardio

Para la clasificación de derrames pleurales se han utilizado los criterios de Light, que permiten diferenciar entre exudados y trasudados pleurales: De acuerdo a estos criterios, un exudado pleural debe cumplir uno de los siguientes criterios, mientras que un trasudado pleural no cumple ninguno de ellos:

- Relación proteínas pleura/suero mayor de 0,5.
- Relación lactato deshidrogenasa (LDH) pleura/suero mayor de 0,6.
- LDH pleural mayor de 2/3 del límite superior sérico de LDH.

Distintos estudios han tratado de identificar parámetros más eficaces que los criterios de Light (Cicero-Sabido, 2006; Sosa-Juárez, 2013; Lee 2013; Light, 2006).

2.2.1 Derrames pleurales de origen infeccioso

Son ocasionados por diferentes bacterias (micobacterias) y gérmenes (bacilos Gram-negativos, y Gram positivos) considerados exudados, subclasificándose en derrames pleurales paraneumónicos. Un derrame pleural paraneumónico (DPP) es aquel que se asocia a una neumonía bacteriana, a un absceso pulmonar o a bronquiectasia y empiemas (presencia de pus) un líquido espeso blanco-amarillo, en el espacio pleural. Aunque la mayoría de los empiemas, tienen un origen paraneumónico, algunos se asocian con traumatismos o un procedimiento quirúrgico (Díez, 2003).

2.2.2. Derrames pleurales malignos

El derrame pleural maligno (DPM) es un exudado, que se define por la presencia de células malignas en el líquido pleural o por su demostración en el tejido pleural obtenido por diferentes procedimientos (biopsia percutánea, toracoscopia, toracotomía, necropsia). El DPM secundario a neoplasias sólidas de estirpe epitelial/carcinomas (DPM-C) es la manifestación de una enfermedad neoplásica metastásica, por tanto, en estado muy avanzado y se relaciona, generalmente, con una corta supervivencia (Pérez-Rodríguez, 2003).

2.2.3. Derrames pleurales inflamatorios no infecciosos

Este tipo de derrames se caracteriza por tener como causa a enfermedades colágeno-vasculares, considerado exudado como las vasculitis que son entidades clínico patológicas caracterizadas por inflamación y lesión de los vasos sanguíneos, con compromiso de su luz

e isquemia de los tejidos. La presentación clínica es fundamental para diagnosticar a estos pacientes (Contran, 2000; Pérez-Rodríguez, 2003).

2.2.4 Otras causas de derrames pleurales

El diagnóstico diferencial de los derrames pleurales (DP) es muy extenso. No sólo incluye los procesos patológicos primarios del pulmón y la pleura, sino también muchos procesos extratorácicos. En relación con la patología digestiva se pueden encontrar DP de varios orígenes, Siendo los más frecuentes, aquellos originados por procesos hepáticos, pancreáticos, secundarios a patología esofágica, esplénica, absceso subfrénico y cirugía abdominal alta como los más frecuentes (Contran, 2000).

3. Drenaje de líquido pleural

3.1 Toracocentesis

La toracocentesis o punción pleural es la prueba que se realiza con la finalidad de extraer líquido de la cavidad pleural, tanto con fines de diagnóstico como terapéuticos. La apariencia macroscópica del líquido pleural sugiere, su origen (etiología). La punción se hace atravesando la pared torácica hasta llegar a la cavidad pleural, por lo que se considera una punción torácica. Radiológicamente se considera un derrame pleural cuando se tiene > 5 cm de altura en la proyección lateral o > 1 cm de espesor en la proyección de decúbito lateral o en la ecografía se puede intentar aspirar con una seguridad razonable. Sólo se necesitan extraer unos 15-20 ml de líquido pleural para un análisis completo del mismo (bioquímico, citopatológico y microbiológico), que se reparten en 3 tubos que contienen heparina. Si es un derrame pleural muy abundante se pueden drenar hasta 1.5L (Ried, 2013; Light, 2011).

3.2 Análisis bioquímico del líquido pleural

El análisis del líquido pleural obtenido mediante toracocentesis permite establecer una causa definitiva o presuntiva del derrame pleural en un 70-80% de los casos. Al líquido pleural se le analiza la lactato deshidrogenasa pleural (LDH) y las proteínas para establecer si es un exudado o trasudado de acuerdo a los criterios de Light. También es importante conocer su aspecto; color, olor, pH, glucosa conteo de eritrocitos, leucocitos y conteo celular diferencial de leucocitos. Otros parámetros que pueden ser útiles en el diagnóstico son: la tinción de Gram que permite diferenciar entre Gram (+) y (-), para visualización de bacterias, tinción de hidróxido de potasio al 10% (KOH) para ver elementos fúngicos, tinción de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), cultivo para hongos, cultivo para micobacterias, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), determinación de niveles de adenosina desaminasa (ADA) y la citología (Kinasewitz, 1998; Cicero-Sabido, 2006; Sosa-Juárez, 2013; Mejía-Olivares, 2013). La distinción entre trasudados y exudados constituye el primer escalón en el diagnóstico diferencial de los derrames pleurales (Mejía-Olivares, 2013). En la Tabla IV se observan las y pruebas indicadas en función del aspecto del líquido pleural así como su diagnóstico.

Tabla IV. Diagnóstico y pruebas indicadas en función del aspecto del líquido pleural

Aspecto del líquido	Prueba indicada	Interpretación del resultado
Hemático	Hematocrito	<1%: no significativo. 1-20%: cáncer, embolia o traumatismo. >50% del hematocrito sérico: hemotórax.
Purulento	Gram y cultivo	Empiema.
Turbio	Centrifugación	Sobrenadante turbio: alto contenido de lípidos.
Sobrenadante turbio	Triglicéridos	>110 mg/dL: quilotórax 50-110 mg/dL: realizar lipidograma. Presencia quilomicrones: quilotórax <50 mg/dL y colesterol >250 mg/dL: pseudoquilotórax.
Achocolatado	Estudio microbiológico	Amibiasis.
Viscoso	Estudio citohistológico	Mesotelioma.
Amarillento-Grisácea	Citología	Células gigantes multinucleadas en fondo granular necrótico: Artritis reumatoide.
Olor amoniacal	Creatinina Pleural	Creatinina pleural /suero> 1: Urinotórax.
Olor pútrido	Gram y cultivo	Infección por microorganismos anaerobios.

4. ANTECEDENTES

4.1 Glucosa

La glucosa constituye el carbohidrato principal para la generación de energía (ATP) en el metabolismo celular. Su catabolismo representa la principal fuente de energía para las células del organismo. La Asociación Americana de la Diabetes indica que la concentración de glucosa en sangre antes de comer (preprandial), usualmente se encuentra en los niveles 70 a 130 mg/dL y 2 horas después de comenzar a comer: en menos de 180 mg/dL en sangre en condiciones normales. Estos niveles se pueden ver afectados en algunas patologías como la diabetes mellítus, o algún trastorno metabólico congénito.

El metabolismo de la glucosa es uno de los principales procesos que se ven afectados durante la transformación de células normales a células cancerosas. Los niveles de glucosa en pacientes que presentan cáncer pueden variar dependiendo del tipo de tumor y de la fase de desarrollo del mismo. Los tumores de crecimiento rápido se caracterizan por su gran capacidad glucolítica, la cual puede condicionar a un aumento en la gluconeogénesis hepática por parte del huésped a partir de lactato, glicerol y diversos aminoácidos; además del aumento en la expresión del transportador de glucosa (GLUT-1), el cual puede correlacionar con el mal pronóstico y baja supervivencia en pacientes con cáncer de ovario y de células escamosas de origen indeterminado (Ayala, 2010; Pinhtiro, 2011).

4.2 Glucosa Pleurala

En ausencia de una patología pleural, la glucosa difunde libremente a través de la membrana pleural y la concentración de glucosa en el fluido pleural es equivalente a la de la sangre (Hooper, 2010).

Como se había mencionado anteriormente, existen diferentes patologías que pueden generar derrame pleural. Al respecto existen numeros estudios que evalúan los niveles de glucosa presente en el derrame pleural.

Rahman y cols., en 2008, demostraron que la concentración de glucosa en líquido pleural no se altera significativamente por el tipo de anticoagulante o aire residual en las muestras (Rahman, 2008).

Tanrikulu y cols., en el 2010, reportaron que los niveles bajos de glucosa (≤ 40 mg/dL), niveles altos de la proteína C reactiva (>50 mg/L), y un nivel sérico de >500 U/L de LDH se pueden asociar con un pobre pronóstico en mesotelioma pleural maligno, indicando que las células de esta neoplasia, utilizan la glucosa pleural para su actividad metabólica. Por lo tanto, niveles de glucosa bajos demuestran una actividad metabólica mayor del tumor.

Por otro lado, Sahn y cols., en el 2013, reportaron que el 80% de los derrames pleurales tuberculosos, tuvieron niveles <60 mg/dl de glucosa, y que el 97.6% tuvo niveles ≥ 45 U/l de adenosina desaminasa; encontrando diferencias significativas en estos parámetros al comprarlos con derrame pleural maligno, empiema/paraneumónico (infeccioso) y trasudativo.

Otros grupos han reportado que niveles bajos de glucosa (<60 mg /dL ó 3.3 mmol/L) pueden ser detectados en derrames paraneumónicos, empiema, pleuritis reumatoide, tuberculosis o malignidad (Hooper, 2010; Porcel, 2002; Saguil, 2014).

4.3 Lactato

El lactato se produce en el citosol, por el brazo fermentativo a partir de la reducción del piruvato y la concomitante oxidación del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH), reacción catalizada por la LDH. El lactato es transportado por la membrana citoplasmática a través del transportador de monocarboxilato (MCT4). Ya que el lactato es el producto final

en la glicólisis anaerobia en muchos organismos, se le ha considerado como producto de deshecho.

Otto Warburg demostró que el metabolismo alterado de las células tumorales producían grandes cantidades de lactato a partir de glucosa aún en presencia de oxígeno (Heiden, 2009).

Hirschhaeuser y cols., en el 2011 sugieren que el lactato tumoral podría asociarse con las metástasis y la baja supervivencia del paciente. Se ha encontrado que el lactato por sí solo, induce la migración de células y la formación de nichos de células tumorales. Además, la radioresistencia se ha correlacionado positivamente con la concentración de lactato, sugiriendo una capacidad anti-oxidativa del lactato. Hallazgos en las interacciones de metabolitos en las células tumorales indican una contribución del lactato para evitar el reconocimiento y destrucción por el sistema inmune. Por lo que la acumulación de lactato en los tumores sólidos es un evento crucial y temprano en el desarrollo de los mismos. La determinación de lactato debería integrarse en los ensayos clínicos para confirmar su relevancia en la biología del cáncer. Sin embargo, existen muy pocos ensayos clínicos que abordan la determinación del lactato en líquido pleural en presencia de neoplasias malignas.

4.4 Lactato Pleural

El lactato en líquido pleural tiene la ventaja de ser un indicador directo de la actividad metabólica celular normal incrementada por una glicólisis anaeróbica. Su concentración en el líquido pleural es la misma que para los niveles séricos: aproximadamente de 1 a 2 mM en condiciones normales.

La determinación de lactato en los distintos fluidos del organismo ha sido usada principalmente para la detección de infecciones bacterianas. Altos niveles de lactato han

sido reportados en fluido cerebroespinal en la meningitis bacteriana, en fluido sinovial en la artritis bacteriana, y en fluido pleural en el empiema bacteriano (Pettersson, 1985).

Pettersson y cols., en 1985 reportaron que el promedio de las concentraciones de lactato en líquido pleural fueron significativamente mayores en pacientes con empiemas (14 mM) y artritis reumatoide (10 mM), que en pacientes con tuberculosis (9mM), cáncer (4mM), derrames pleurales de origen no especificado (3mM) y falla cardiaca congestiva (2mM). En este mismo trabajo, en todos los grupos de pacientes, la concentración promedio de lactato fue mayor en líquido pleural que en plasma, indicando que el lactato fue producido localmente.

4.5 Acidosis pleural

La acidosis es un trastorno en el equilibrio ácido-básico del cuerpo en el cual el pH en sangre disminuye hasta un valor inferior a 7.36, la acidosis puede reflejar hipovolemia, hipoxia, sepsis y utilización del metabolismo alternativo en la producción de energía.

La acidosis en el líquido pleural puede proporcionar información diagnóstica y pronóstica en ciertos escenarios clínicos. Por ejemplo, un pH bajo en líquido pleural puede asociarse con un derrame paraneumónico no purulento, lo que sugiere que el líquido pleural debe ser drenado del espacio pleural, proceso necesario para resolver la infección (Porcel, 2009). Sin embargo, Rahman y col., en 2008, demostraron que la exactitud en la medición del pH pleural es dependiente del método de recolección de la muestra. La presencia de aire residual, el uso de lidocaína y el análisis tardío, alteran significativamente la medición de pH. Por lo que en vez de medir el pH pleural, en el presente estudio decidimos medir la cantidad de ácido acético presente en los derrames pleurales.

4.6 Ácido acético

La producción local de ácido láctico, y ácido carbónico (H_2CO_3), como productos finales del metabolismo anaeróbico de la glucosa, se consideraron inicialmente los responsables de la acidosis en el líquido pleural (Pettersson, 1985).

Sin embargo Knowles y cols., en 1974, reportaron que es posible la producción y utilización de ácido acético en mamíferos. La fuente de ácido acético en mamíferos no herbívoros y en todos los mamíferos en hambruna no se conoce claramente; sin embargo, los ácidos grasos de cadena larga o el piruvato pueden ser convertidos en acetil CoA (AcCoA), la cual puede ser hidrolizada a ácido acético por la enzima acetil CoA hidrolasa. El recambio del acetato sanguíneo es rápido en mamíferos herbívoros debido a que tienen la capacidad de utilizar acetato por medio de la enzima acetil CoA sintetasa y se presentan alta actividad de esta enzima (Knowles, 1974).

La presencia de acetato es también significativa en mamíferos no herbívoros, debido a que es rápidamente catabolizado de la sangre si es inyectado *in vivo* o generado de precursores como el etanol. El acetato está presente en la sangre de mamíferos en concentraciones que van de un rango de 0.1 a 0.5 mM, valores que están muy por debajo de aquellos encontrados en herbívoros (Knowles, 1974).

En este trabajo investigamos la distribución de las concentraciones de ácido acético en el líquido pleural de pacientes con tuberculosis y adenocarcinoma.

4.7 Glutamina

La glutamina desempeña varias funciones metabólicas importantes en la célula. Sirve como una fuente de carbono para la producción de energía, carbono y nitrógeno, y contribuye a las reacciones biosintéticas regulando la homeostasis celular. Daye y cols., en el 2012,

reportan una tasa elevada en el consumo de glutamina por muchos tipos de cáncer y en la proliferación celular.

Pieter y cols., en 2012, describen que las células tumorales necesitan tanto glucosa como glutamina para su viabilidad y crecimiento. Siendo la reprogramación metabólica una de las principales características del cáncer. Se ha reportado que la glutamina en líneas de cáncer de pulmón de células no pequeñas es esencial para la proliferación celular.

El papel de otros productos intermediarios de la vía glucolítica y vías alternas para la generación de energía y la síntesis de macromoléculas en las células cancerosas, sólo se ha comenzado a identificar. En particular se ha comenzado a caracterizar el metabolismo alterado de la glutamina en células tumorales (Mohamed, 2014).

4.8 Glutamato

El glutamato es un aminoácido no esencial, un importante sustrato bioenergético de la proliferación de células normales y neoplásicas, y un neurotransmisor excitatorio que está involucrado activamente en vías bioenergéticas, metabólicas y de señalización oncogénicas. La señalización de glutamato activa una familia de receptores llamados receptores de glutamato metabotrópicos e ionotrópicos que se han relacionado con desórdenes cerebrales crónicos, como esquizofrenia y enfermedades neurodegenerativas (Willard, 2013).

El glutamato regula la proliferación y la migración de las neuronas durante el desarrollo embrionario del SNC, pero no se sabe si influye en la proliferación y migración de las células tumorales. Se ha demostrado que los antagonistas de glutamato como el N-Metil-D-Aspartato (NMDA) inhiben la proliferación de células tumorales humanas (Rzeski, 2001). En otro estudio, se ha reportado que la privación de glutamato en células de cáncer de próstata disminuye la proliferación, la migración y la invasión dando lugar a la muerte celular por apoptosis (Koochekpour, 2012).

El glutamato se ha relacionado con la tumorigénesis a través de la activación del receptor AMPAR. Herner y cols., en 2011, demostraron que la activación del receptor AMPAR mediada por glutamato incrementa la activación y migración de células de cáncer pancreático por medio de la activación de la vía MAPK clásica. El glutamato podría servir como un interruptor molecular que disminuye el umbral de la señalización oncogénica inducida por K-ras, incrementando las lesiones precursoras de la transformación maligna de las de cáncer de páncreas.

Koochekpour y cols., en 2012, midieron los niveles de glutamato sérico en personas sanas y en pacientes caucásicos y afroamericanos con cáncer de próstata primario y metastásico. Los niveles séricos de glutamato en individuos sanos fue de $0.56 \pm 0.03 \mu\text{M}$, mientras que en pacientes con cáncer de próstata primario fue de $10.4 \pm 2.2 \mu\text{M}$ y en pacientes con cáncer de próstata metastásico de $323.7 \pm 51.4 \mu\text{M}$; encontrando únicamente diferencia significativa en los niveles séricos de glutamato en pacientes afroamericanos con cáncer de próstata metastásico con respecto al primario. También reportan una correlación positiva en la cantidad sérica del glutamato y la agresividad del cáncer de próstata.

5. Justificación

En México los derrames pleurales son ocasionados principalmente por cáncer pulmonar, el cual representan entre 4 a 10 % de las patologías respiratorias en servicios de neumología. La determinación de la etiología de los derrames pleurales se basa en 3 criterios conocidos como criterios de Light: la relación proteica determinada en el derrame pleural a nivel serico, la relación de unidades por litro de LDH determinada en el derrame pleural y a nivel serico y la concentración de LDH en líquido pleural más de las dos terceras partes del límite superior del valor normal en suero. Además, el líquido pleural contiene diferentes concentraciones de otros metabolitos como el lactato, glutamina, glutamato y glucosa. Sin embargo son múltiples las enfermedades que pueden afectar a la pleura, y el diagnóstico diferencial muchas veces requiere de tiempo de hospitalización y la aplicación de procedimientos de mayor riesgo para el paciente. Por lo que contar con marcadores que puedan servir como una herramienta de apoyo para el médico, se decidió probar la presencia y utilidad diagnóstica de los metabolitos: glucosa, lactato, glutamina y glutamato y ácido acético en el líquido pleural de pacientes con derrame pleural maligno y no maligno.

6. Hipótesis

Las células tumorales presentan un metabolismo alterado en donde se presenta un alto consumo de glucosa con producción de ácido láctico aún en presencia de oxígeno, fenómeno conocido como efecto Warburg. También se ha observado que tienen incrementada la glutaminólisis, es decir el metabolismo de la glutamina.

Si las células tumorales de los pacientes con adenocarcinoma presentan el efecto Warburg, además de la glutaminólisis incrementada, entonces las concentraciones de los metabolitos glucosa, lactato, glutamina y glutamato serán diferentes con respecto a las concentraciones cuantificadas de los metabolitos encontrados en derrame pleural de origen no maligno.

7. Objetivo

Determinar las concentraciones de los metabolitos: glucosa, lactato, glutamina y glutamato y ácido acético presentes en derrames pleurales de pacientes con cáncer pulmonar así como con tuberculosis y comparar sus concentraciones en ambos tipos de patologías.

7.1 Objetivos particulares.

7.1.1) Generar una base de datos a partir de las muestras de derrame pleural almacenadas en el laboratorio de cáncer pulmonar del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”.

7.1.2) Determinar la concentración de los metabolitos: glucosa, glutamina, glutamato, lactato y ácido acético en los líquidos pleurales

7.1.3) Relacionar si los metabolitos arriba mencionados pueden emplearse como marcadores para el diagnóstico asociado a cáncer pulmonar en particular al tipo adenocarcinoma.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Recolección de muestras.

El Laboratorio de Cáncer Pulmonar del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER), cuenta con un banco de líquidos pleurales obtenidos por toracocentesis. Las muestras biológicas incluidas en este estudio, son muestras recolectadas desde el año 2000 hasta la fecha 2014, las cuales se conservaron en congelación a una temperatura de -20°C . Actualmente se cuentan con alrededor de 629 muestras.

Se llevó a cabo la organización y la identificación de las muestras procedentes de derrames pleurales de pacientes que asistieron a la consulta en el INER. También se buscó el diagnóstico definitivo en los archivos clínicos del INER. Los pacientes que se cuenta con muestra de derrame pleural asignando a cada muestra su diagnóstico definitivo, encontrando el sexo, la edad, y el número de casos con cada una de las afecciones causantes de derrame pleural. Creando así una base de datos.

8.2 Población de estudio

La descripción detallada de la población de estudio se presenta en la Tabla V.

Tabla V. Población de estudio					
Derrame pleural	Diagnóstico	Número de casos	Relación de genero		Rango de Edad
			Hombres	Mujeres	
Maligno	Adenocarcinoma	77	41	36	(27-92)
	Mesotelioma	14	9	5	(46-88)
	Cáncer de Células pequeñas	13	12	1	(38-72)
	Tumores metastásico	29	19	10	(27-82)
Infeccioso	Tuberculosis	29	19	10	(19-87)
	Neumonías	6	5	1	(23-96)
	Cardiopatías	3	2	1	(73-80)

8.3 Estrategia Experimental

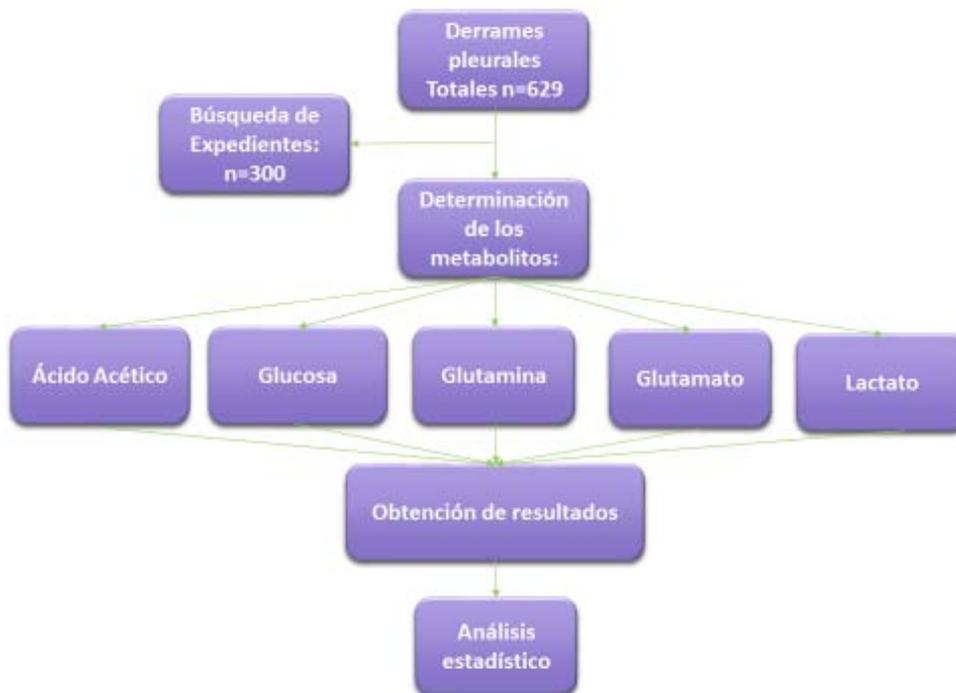


Figura 1. Estrategia experimental.

8.4 Medición de los metabolitos glucosa, lactato, glutamina y glutamato por medio del analizador bioquímico YSI

Las muestras se clasificaron y se descongelaron a una temperatura de 4°C para su posterior manejo. Una vez descongeladas se procedió a realizar alícuotas de 950µL en tubos eppendor de 1.5ml y a su vez se depositaron 25µL por triplicado en una placa de 96 pozos. Esta placa de 96 pozos se colocó en el analizador bioquímico YSI 2900 el cual analizó cada una de las muestras dependiendo de la calibración del equipo. Primero se colocaron las membranas de glucosa y lactato, después las membranas de glutamina y glutamato (Figura 2) . El analizador bioquímico por medio de una reacción redox realiza las mediciones de cada uno de los metabolitos arrojando la cantidad que existe en cada una de las muestras en mmol/L.

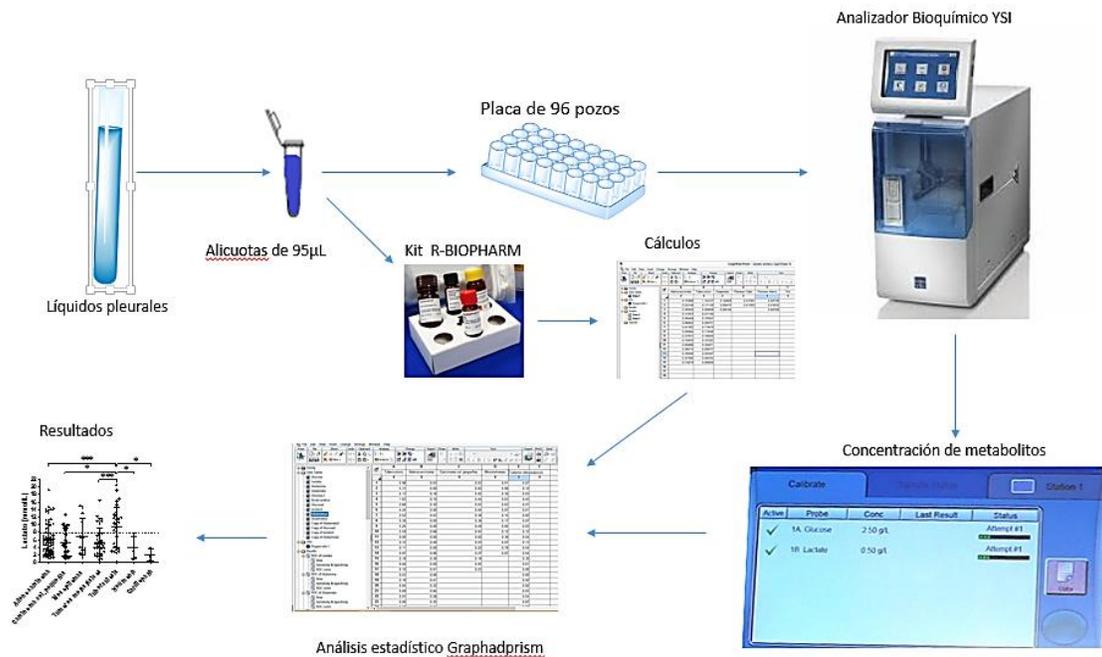


Figura 2. Esquema del procesamiento de los líquidos pleurales.

El analizador bioquímico YSI es un equipo automatizado para la medición analítica de diferentes metabolitos en un periodo muy corto. El analizador bioquímico YSI funciona por medio de una reacción de óxido reducción del electrodo con respecto al peróxido

producido, la reacción generará agua más oxígeno y este es directamente proporcional a la concentración del analito a medir.

Las membranas YSI contienen tres capas. La primera capa, policarbonato poroso, limita la difusión exclusiva del sustrato hacia la segunda capa que contiene a la enzima inmovilizada, que es específica para el metabolito que se va a medir. La tercera capa, acetato de celulosa, permite el paso de moléculas pequeñas, como el peróxido de hidrógeno, para alcanzar el electrodo, eliminando muchos compuestos electroquímicamente activos que podrían interferir con la medición (Figura 3).

Una enzima específica para el sustrato de interés se encuentra inmovilizada entre las dos capas de las membrana, policarbonato y acetato de celulosa. El sustrato es oxidado cuando entra en contacto con la capa de la enzima, produciendo peróxido de hidrógeno, que pasa a través de acetato de celulosa a un electrodo de platino donde el peróxido de hidrógeno es oxidado. La corriente resultante es proporcional a la concentración del sustrato.

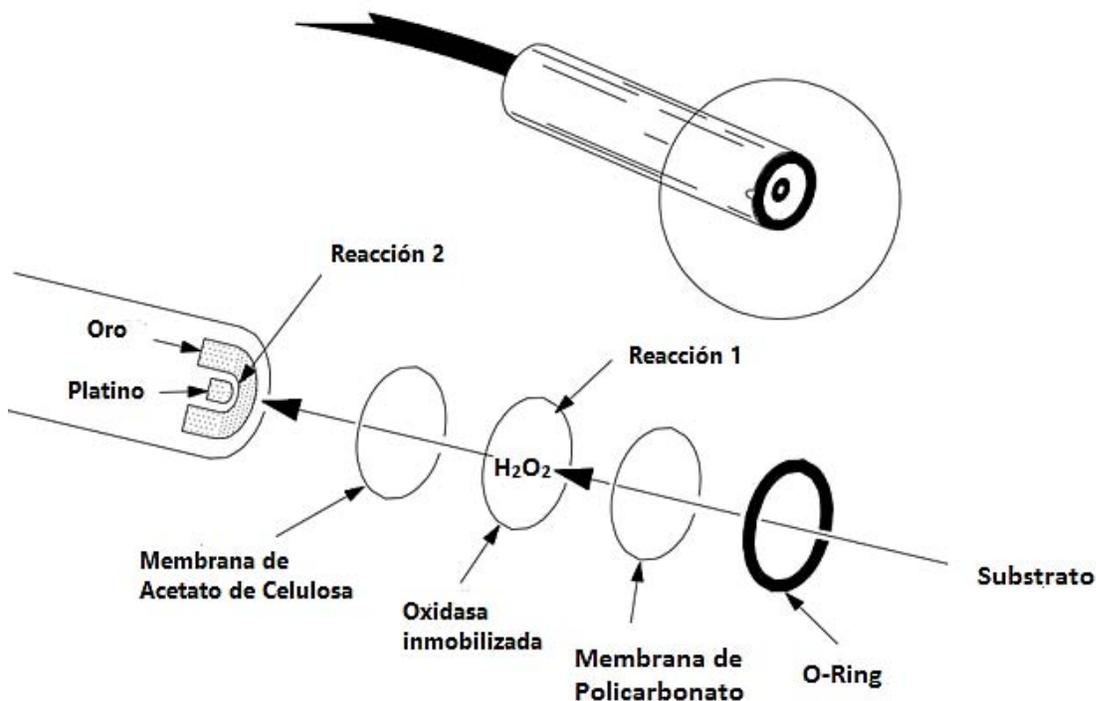


Figura 3. Componentes de la membrana del analizador bioquímico YSI.

8.5 Medición de ácido acético por espectofotometría UV

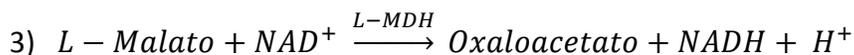
La concentración de ácido acético se determinó por medio del método de UV utilizando el kit de Bohreing Mannheim (cat. No. 10148261035), siguiendo las indicaciones del fabricante. La determinación se basa en la formación de NADH medido por el aumento de la absorción a 340nm, dado por el equilibrio de las siguientes reacciones:



Acetil-CoA reacciona con oxalacetato a citrato en presencia de citrato sintetasa (CS) (reacción 2)



El oxaloacetato requerido para la reacción 2 se forma a partir de L-Malato y nicotinamida adenina dinucleotido (NAD) en presencia de L-malato deshidrogenasa (L-MDH). En esta reacción el NAD es reducido a NADH.



8.6 Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico Graphadprism versión 5. Las concentraciones de glucosa, lactato y ácido acético presentaron una distribución normal, por lo que para conocer las diferencias estadísticas se aplicaron pruebas de Análisis de Varianza y Dunnett. Las concentraciones de glutamina y glutamato presentaron una distribución no paramétrica, por lo que para conocer las diferencias estadísticas se aplicaron pruebas de Kruskal-Wallis y Dunns.

Se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson entre los diferentes metabolitos estudiados. Además, se calcularon los parámetros diagnósticos de los metabolitos: glucosa, glutamina, glutamato y ácido acético asociados a adenocarcinoma o tuberculosis, haciendo las curvas ROC para cada uno de los metabolitos (Apendice 1).

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos se resumen, analizan y discuten en esta sección.

9.1 Determinación de los niveles de glucosa, lactato, glutamina y glutamato en los diferentes grupos estudiados

La distribución de las concentraciones de glucosa presentaron un comportamiento normal en los diferentes grupos estudiados, la concentración de la glucosa fue significativamente menor ($p < 0.05$) en el grupo de tuberculosis con respecto a los grupos de adenocarcinoma y cardiopatías (Figura 4).

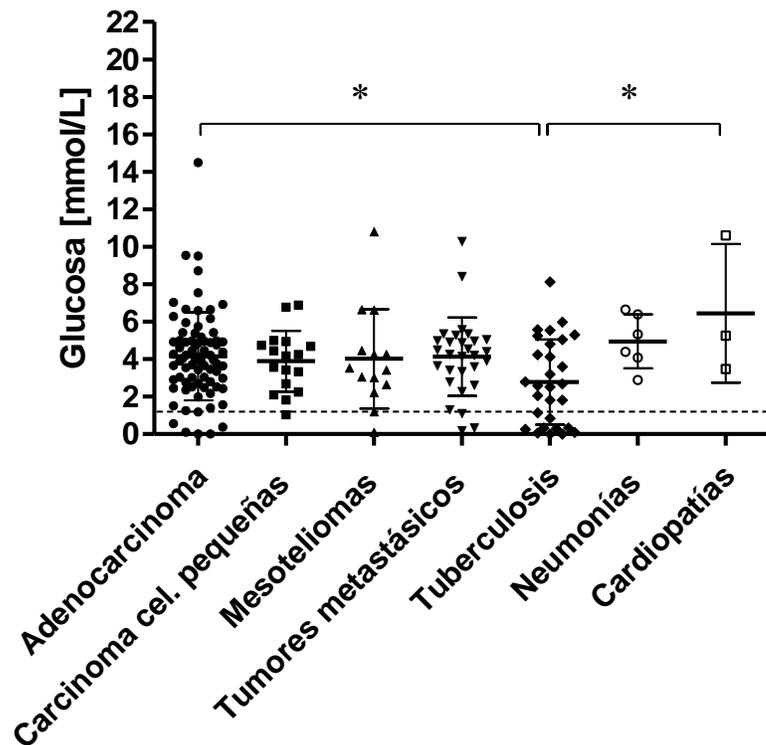


Figura 4. Distribución de la concentración de glucosa en líquido pleural para los grupos. El valor de corte se representa por la línea discontinua. Las barras horizontales indican la media y la desviación estándar en cada grupo. * $P < 0.05$.

La distribución de las concentraciones de lactato presentaron un comportamiento normal en los diferentes grupos estudiados. La concentración de lactato fue significativamente mayor ($p < 0.001$) en tuberculosis con respecto a los grupos de adenocarcinoma y tumores metastásicos. La concentración de lactato fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en tuberculosis con respecto a los grupos carcinoma de células pequeñas, neumonías y cardiopatías (Figura 5).

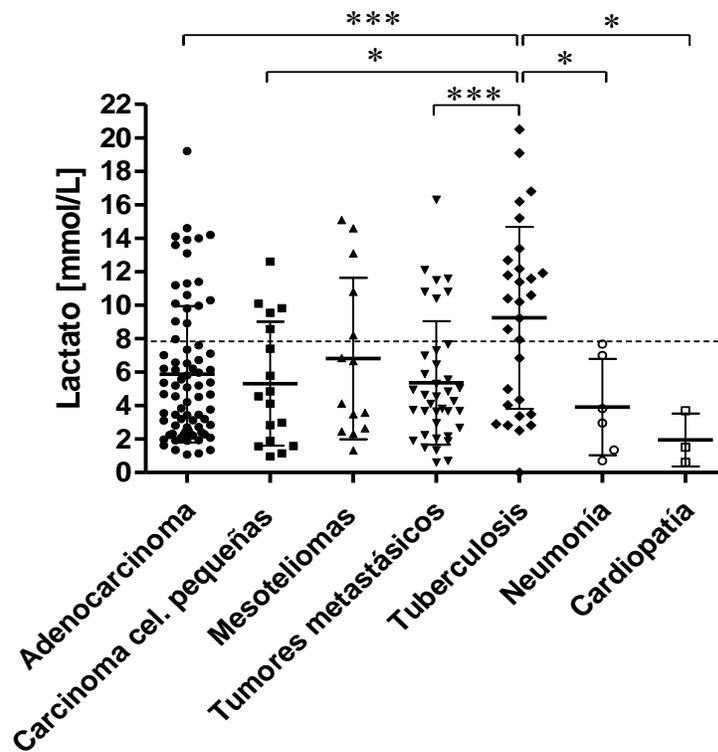


Figura 5. En esta gráfica se representa la distribución de la concentración de lactato en líquido pleural para los grupos. El valor de corte se representa por la línea discontinua. Las barras horizontales indican la media y la desviación estándar en cada grupo. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

En el caso de la distribución de la concentración de glutamina encontramos que las diferentes poblaciones de adenocarcinoma, tumores metastásicos y tuberculosis presentaron un comportamiento no paramétrico. Y aunque no encontramos diferencias

significativas entre los grupos estudiados, se observa una tendencia a encontrarse más elevada en tuberculosis (Figura 6).

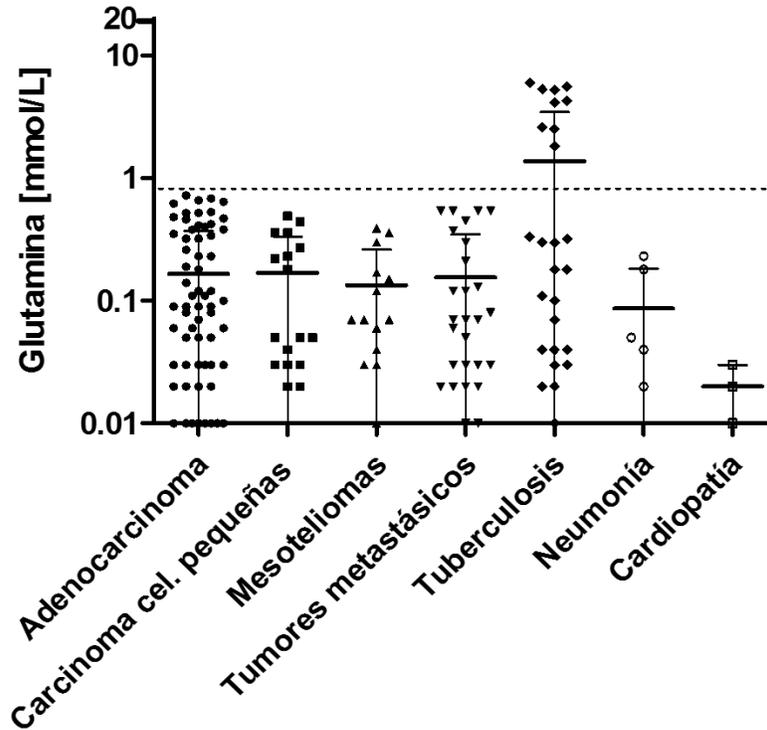


Figura 6. En esta gráfica se representa la distribución de la concentración de glutamina en líquido pleural para los grupos. El valor de corte se representa por la línea discontinua. Las barras horizontales indican la media y la desviación estándar en cada grupo.

La distribución de la concentración de glutamato en los diferentes grupos estudiados presentó un comportamiento normal, con excepción del grupo de tuberculosis que presentó un comportamiento no paramétrico. La concentración de glutamato fue significativamente mayor en tuberculosis ($p < 0.01$) con respecto a los grupos de adenocarcinoma, carcinoma de células pequeñas y mesotelioma. La concentración de glutamato en tuberculosis fue significativamente mayor ($p < 0.05$) con respecto al grupo de tumores metastásicos (Figura 7).

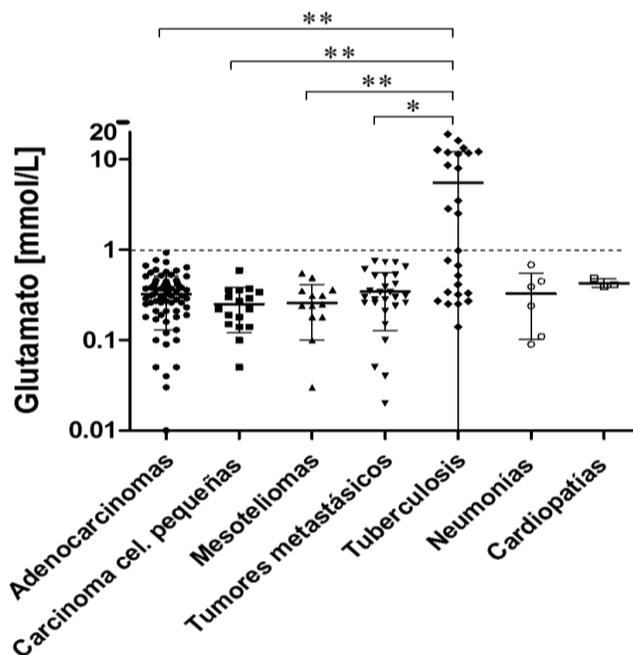


Figura 7. En esta gráfica se representa la distribución de la concentración de glutamato en líquido pleural para los grupos. El valor de corte se representa por la línea discontinua. Las barras horizontales indican la media y la desviación estándar en cada grupo. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

El diagnóstico definitivo de cáncer pulmonar se establece mediante el hallazgo de las células malignas en el estudio citológico o histológico. Sin embargo, debido a que estos estudios presentan algunas limitaciones técnicas, la evidencia de las células malignas no siempre es posible. En la práctica el diagnóstico diferencial con tuberculosis es complicado ya que, ambas patologías pueden presentar signos y síntomas parecidos. Por lo anterior decidimos hacer un análisis mayor enfocándonos a estas dos patologías por lo que en la Tabla VI se presentan la media y desviación estándar de los distintos metabolitos en el líquido pleural de adenocarcinoma pulmonar y tuberculosis.

Tabla VI. Niveles de los distintos metabolitos en el líquido pleural de los diferentes grupos estudiados

Metabolito	Adenocarcinoma (mmol/L)	Tuberculosis (mmol/L)
Glucosa	4.15 ± 2.34	2.78 ± 2.27
Lactato	5.87 ± 4.1	9.24 ± 5.44
Glutamina	0.16 ± 0.21	1.36 ± 2.08
Glutamato	0.32 ± 0.19	5.52 ± 6.63
Ácido acético	0.28 ± 0.08	0.20 ± 0.06

Aplicando una prueba estadística de *t de student* para los grupos de adenocarcinoma y tuberculosis encontramos diferencia significativa en los niveles de glucosa ($p= 0.0077$), así como para los niveles de lactato ($p= 0.0008$) (Tabla VI). También observamos una correlación moderada inversamente proporcional de las concentraciones de glucosa y lactato tanto en el grupo de adenocarcinoma como en el grupo de tuberculosis Tabla VII y VIII, Figura 8 A y B. Por lo que a menor concentración de glucosa mayor concentración de lactato. También observamos que el grupo de adenocarcinoma presentó una mayor concentración de glucosa (AD>1.17) con una menor producción de lactato (8.75>AD). Por el contrario, el grupo de tuberculosis presentó una menor concentración de glucosa (1.17>TB) con una mayor producción de lactato (TB>8.75) Tabla IX. Lo que nos permite sugerir que aun cuando las células tumorales utilizan en gran medida la glucosa para producir lactato, el microorganismo de la tuberculosis utiliza una mayor cantidad de glucosa para cubrir sus requerimientos metabólicos produciendo una mayor cantidad de lactato.

Tabla VII. Correlación entre las concentraciones de glucosa, lactato, glutamina, glutamato y ácido acético en líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma.

	Lactato	Glutamina	Glutamato	Ácido acético
Glucosa	r=-0.34 p=0.0028	r=-0.007 p=ns	r=-0.17 p=ns	r=-0.18 p=ns
Lactato		r=0.06 p= ns	r=0.08 p=ns	r=0.39 p=ns
Glutamina			r=-0.72 p<0.0001	r=0.22 p=ns
Glutamato				r=-0.1 p=ns

Tabla VIII. Correlación entre las concentraciones de glucosa, lactato, glutamina, glutamato y ácido acético en líquido pleural de pacientes con tuberculosis.

	Lactato	Glutamina	Glutamato	Ácido acético
Glucosa	r=-0.50 p=0.0060	r=0.39 p=0.0346	r=-0.28 p=ns	r=-0.27 p=ns
Lactato		r=-0.08 p=ns	r=0.67 p<0.001	r=0.07 p=ns
Glutamina			r=0.39 p=0.035	r=-0.39 p=ns
Glutamato				r=-0.1430 p=ns

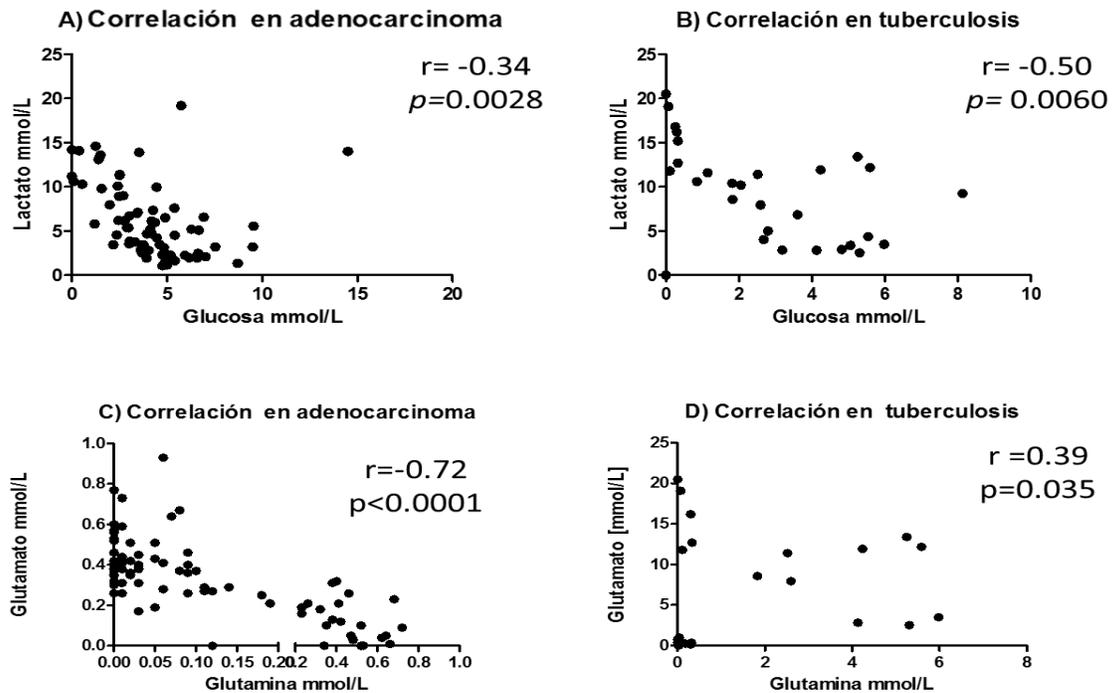


Figura 8. En esta figura se presenta las gráficas de correlación con niveles más altos (moderado a fuerte). Observando la distribución de la correlación (r) y el valor de p (p).

También observamos que el grupo de tuberculosis presenta una mayor concentración de glutamina ($TB > 0.8$) así como una mayor concentración de glutamato; ($TB > 1.0$) por el contrario el grupo de adenocarcinoma presentó una menor concentración de glutamina ($0.8 > AD$) con una menor concentración de glutamato ($1.0 > AD$) Tabla IX. Lo que sugiere que cuando las células tumorales utilizan la glutamina para producir glutamato, este último no se acumula si no que se sigue utilizando en la glutaminólisis, fenómeno que ya ha sido reportado (Pieter, 2012). En el caso de la tuberculosis se observó una acumulación de glutamato lo que podría indicar que el metabolismo del patógeno no es tan dependiente de este aminoácido.

Aplicando una prueba estadística de *t de student* para los grupos de adenocarcinoma y tuberculosis encontramos diferencia significativa en los niveles de glutamina ($p= 0.035$), así como para los niveles de glutamato ($p= 0.0001$). También observamos una correlación inversamente proporcional de las concentraciones de glutamina y glutamato tanto en el grupo de adenocarcinoma pero no en el grupo de tuberculosis Tabla VII y IX, Figura 8 C y D. Por lo que a menor concentración de glutamina mayor concentración de glutamato. Este comportamiento apoya el hecho de que muchas células tumorales se también observa una adicción a la glutamina a pesar de ser un aminoácido no esencial ya que puede ser sintetizado a partir de glucosa. La alta velocidad de consumo de glutamina podría indicar que puede ser utilizado como donador de nitrógeno además de ser un substrato mitocondrial primario requerido para el mantenimiento del potencial e integridad de la membrana mitocondrial (Wise, 2010).

En el caso de tuberculosis observamos dos comportamientos interesantes: uno es una correlación fuerte entre las concentraciones de glucosa y glutamina y una correlación fuerte entre las concentraciones de lactato y glutamato (Figura 9), lo que podría indicar que si el bacilo de *M. tuberculosis* se encuentra metabólicamente activo consumirá glucosa y glutamina produciendo lactato y glutamato respectivamente. En el caso de los adenocarcinomas, no encontramos estas correlaciones, posiblemente debido a que la desregulación metabólica que promueve y mantiene el desarrollo del cáncer involucra la participación de un mayor número de vías metabólicas en un microambiente mucho más complejo (Romero-García, 2011).

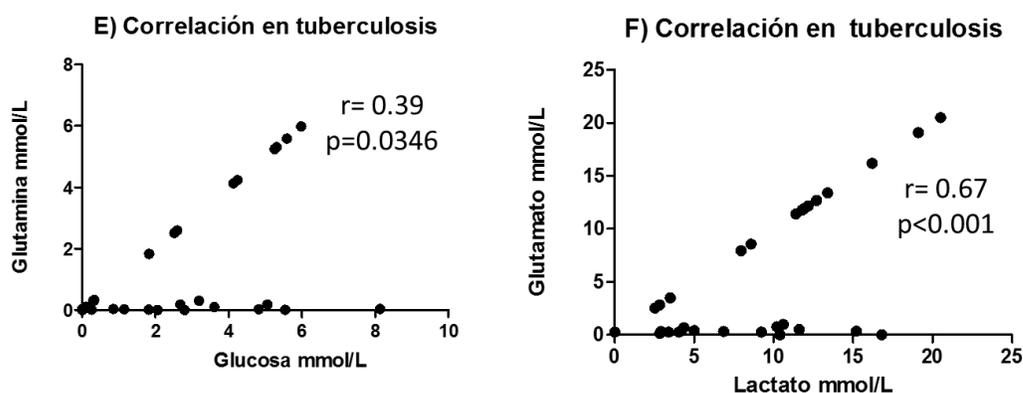


Figura 9. En esta figura se presenta las gráficas de correlación con niveles más altos (moderado a fuerte). Observando la distribución de la correlación (r) y el valor de p.

Tabla IX. Valores de corte y parámetros diagnósticos en líquido pleural

Metabolito	Valor de corte [mmol/L]	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP ¹	VPN ²	Exactitud
Glucosa	AD >1.17 > TB	93.4	34.5	0.79	0.79	0.85
Lactato	TB > 8.75 > AD	76.6	55.2	0.82	0.47	0.71
Glutamina	TB > 0.8 > AD	100	31.0	0.79	1.0	0.81
Glutamato	TB > 1.0 > AD	100	48.0	0.84	1.0	0.86
Ácido acético	AD > 0.28 > TB	73.3	93.3	0.83	0.92	0.78

¹Valor Predictivo Positivo, ²Valor Predictivo Negativo para los grupos de; AD: Adenocarcinoma; TB: Tuberculosis.

Además decidimos incluir el análisis de ácido acético debido a que en un principio pensamos que los niveles del ácido acético podrían correlacionar con el metabolismo de *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo encontramos una concentración significativamente mayor de ácido acético en adenocarcinoma respecto a tuberculosis,

(Tabla VI, Figura 10). El análisis de correlación no mostró relación significativa en adenocarcinoma y en tuberculosis (Tabla VIII y IX). Este comportamiento nos sugiere que probablemente el origen del ácido acético, en el caso de los adenocarcinomas proviene del metabolismo de la glucosa y en el caso de la tuberculosis posiblemente provenga del metabolismo de la glutamina.

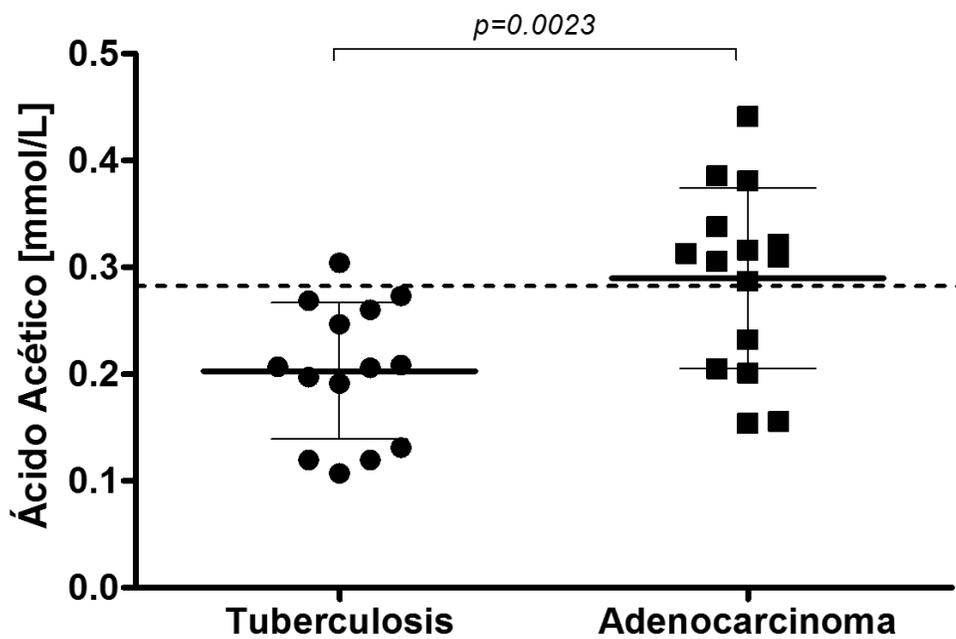


Figura 10. En esta gráfica se representa la distribución de la concentración de ácido acético en líquido pleural para los grupos. El valor de corte se representa por la línea discontinua. Las barras horizontales indican la media y la desviación estándar en cada grupo.

9.2 Determinación de los parámetros diagnósticos asociados a adenocarcinoma utilizando como marcadores los metabolitos: glucosa, lactato, glutamina, glutamato y ácido acético

Para el diagnóstico de una enfermedad se realizan una serie de análisis clínicos los cuales proporcionan una serie de valores numéricos. En esos casos se considera enfermedad la posesión de un valor por encima del valor límite umbral que previamente se ha definido. El problema en estos casos surge cuando se desea conocer cuál es el valor límite más adecuado para obtener un resultado confiable.

El cálculo del valor de corte crítico más adecuado en una prueba diagnóstica se realiza mediante las curvas ROC, basadas en la representación de la curva definida para cada valor límite, según la sensibilidad de la prueba (S) en el eje de las ordenadas y el porcentaje de falsos positivos para la prueba (1-E) en el eje de las abscisas. Posteriormente se traza una recta para unir los puntos $S=1$ y $1-E=1$, el punto donde ésta cruza la curva constituye el valor límite crítico o “valor de corte” más adecuado a utilizar (Apéndice 1).

Por medio del uso de la curva ROC, se graficó como presencia de enfermedad, los valores asociados a adenocarcinoma y ausencia de enfermedad los valores asociados a tuberculosis, se seleccionó el valor de corte asociado a adenocarcinoma una concentración de glucosa mayor de 1.17 mmol/L, y una concentración de ácido acético superior a 0.28 mmol/L. En la Tabla VII. se pueden observar los parámetros diagnósticos asociados a este valor de corte para glucosa.

También se seleccionaron los valores de corte asociados a adenocarcinoma, lactato menor de 8.75 mmol/L, glutamina menor de 0.8 mmol/L, y una concentración de glutamato inferior a 1.0 mmol/L. En la Tabla VII. se pueden observar los parámetros diagnósticos asociados a este valor de corte para lactato, glutamina y glutamato.

Los metabolitos que presentaron el mejor valor de sensibilidad (100%) fueron glutamina y glutamato, Esto indica que la determinación de glutamina y glutamato serán positivas en presencia de enfermedad. Pero el metabolito que presentó la mayor especificidad fue el ácido acético (93.3%), lo que indica que la terminación de ácido acético será negativa en ausencia de enfermedad. Estos resultados sugieren que la asociación de estos marcadores puede ser de utilidad en apoyo al diagnóstico de cáncer pulmonar. Sin embargo, para poder hacer pruebas múltiples se requiere hacer la determinación de ácido acético en las muestras faltantes de derrame pleural.

10. CONCLUSIONES

- 1.- Las bajas concentraciones de glucosa en tuberculosis podrían estar relacionadas con el microorganismo causante de la afección mientras son más altas las concentraciones de glucosa en adenocarcinoma.
- 2.- La concentración de lactato es mayor en tuberculosis debido al alto consumo por el microorganismo comparadas con las concentraciones de lactato en adenocarcinoma debido a la vía glucolítica.
- 3.- Las concentraciones de glutamina y glutamato son mayores en tuberculosis ya el microorganismo no utiliza eficientemente estos metabolitos por lo que podrían estarse acumulando mientras que las concentraciones en adenocarcinoma son menores debido a que las células tumorales utilizan la vía anapleótica (glutaminólisis) para obtener energía.
- 4.- La correlación de glutamina – glucosa y lactato - glutamato podría ser un parámetro diferencial entre adenocarcinoma y tuberculosis.
- 5.- La determinación de ácido acético se puede utilizar para discriminar pacientes con adenocarcinoma y tuberculosis.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aldaco, S. F., Pérez, P., Cervantes Sánchez, G., and Torrecillas, L. Mortalidad por cáncer en México 2000-2010: el recuento de los daños. *GAMO*. 2012; 11: (371-379).
- Amr, M., Deng, X., Khuri, F.L. and Owonikoko, T.K. Altered glutamine metabolism and therapeutic opportunities for lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2014; 15: (7-15).
- Ayala, F.R., Rocha R.M., Carvalho, K.C., Carvalho A.L., Cunha, I.W., Lourenço S.V. and Soares, F.A. GLUT1 and GLUT3 as potential prognostic markers for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Molecules*. 2010; 15: (2374-2387).
- Carla R.M., and Patiño, Zarco M. Cáncer de Pulmón. *Anal de Radiol Mexi* 2009; 1:(33-45).
- Cicero-Sabido, R., Páramo-Arroyo, R.F. and Navarro-Reynoso, F.P. Procedimientos quirúrgicos en 156 casos de derrame pleural. Resultados inmediatos. *Cir Ciruj*. 2006; 74: (409-414).
- Contran, K. C. Pleura. *Patología Estructural y Funcional*. Robbins.2000; (738-741).
- Chang, A. E., Ganz, P., Hayes, D.F., Kinsella, T., Pass, H.I., Schiller, J.H., Stone, R.M., Strecher, V. *Oncology An Evidence-Based Approach*. New York, Springer. Edition 2006; (545-621).
- Dayea, D. and Wellena, K.E., Metabolic reprogramming in cancer: Unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2012; 23: (362-369).
- Díaz Nueva G. Derrames pleurales quilosos (quilotórax y pseudoquilotórax). En: Pérez Rodríguez E, Villena Garrido MV, editores. *Enfermedades de la pleura*. Monografías NEUMOMADRID. 1ra ed. Madrid: Ergón; 2003: (157-164).
- Díez, J.M., Chinarro, B.J. and Ventura, A.A. Derrames pleurales paraneumónicos y empiemas. *Enfermedades de la pleura*. Monografías NEUMOMADRID. 1ra ed. Madrid: Ergón; 2003: (69-93).
- Formentini, L., Martínez-Reyes I., and Cuezva, J.M., The mitochondrial bioenergetic capacity of carcinomas. *IUBMB Life*. 2010; 62(7): (554–560).
- Frenzel, A., Lovén, J., and Henriksson, M.A. Targeting MYC-Regulated miRNAs to combat cancer. *Genes & Cancer*. 2010; (1(6) 660–667).
- Früh, M., De Ruyscher, D., Popat, S., Crinò, L., Peters, S., Felip, and E. ESMO Guidelines Working Group. Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013; 6: vi99-105.

- Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Vitale, I., Rigoni, A., Vacchelli, E., Michaud, M., Zischka, H., Castedo, M. and Kroemer, G. Mitochondrial gateways to cancer. *Mol Aspects Med.* 2010; 31: (1-20).
- Gonzalez, B.N. Lactato como biomarcador para distinguir entre derrame pleural maligno, paraneumonico y por tuberculosis. Tesis de posgrado UNAM. 2012.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5): (646-674).
- Herner, A., Sauliunaite, D., Michalski, W., Erkan, M., De Oliveira T., Abiatari, I., Kong, B., Esposito, I., Friess, H. and Kleeff, J. Glutamate increases pancreatic cancer cell invasion and migration via AMPA receptor activation and Kras-MAPK. *Int J Cancer.* 2011; 129: (2349–2359).
- Hirschhaeuser, F., Sattler, U.G.A. and Mueller-Klieser, W. Lactate: A Metabolic Key Player in Cancer. *Cancer Res.* 2011; 71(22): (6921-5).
- Hooper, C., Lee Y. C., Maskell, N. and on behalf of the BTS Pleural Guideline Group. Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society pleural disease guideline 2010. *Thorax.* 2010; 65(4-17).
- Kinasewitz, G. T., Pleural Fluid Dynamics and Effusions. En Fishman's, Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders. China, McGrawHill Companies 1998; (1389-1409).
- Koochekpour, S., Majumdar, S., Azabdaftari, G., Attwood, K., Scioneaux, R., Subramani, D., Manhardt, C., Lorusso, G.D., Willard, S.S., Thompson, H., Shourideh, M., Rezaei, K., Sartor, O., Mohler, J.L. and Vessella, R.L. Serum glutamate levels correlate with Gleason score and glutamate blockade decreases proliferation, migration, and invasion and induces apoptosis in prostate cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2012; 21: (5888-5901).
- Kuman. Patología Estructural y funcional. En C. K.C, Robbins & Contran Patología Estructural y funcional (2006). (pág. 1449). España: Springer.
- Lee, Y. C. Pleural Anatomy and Fluid Analysis. En Principles and Practice of Interventional Pulmonology 2013;. New York: Springer Science Business Media. (545-555).
- Lekic, M., Kovac, V., Triller, N., Knez, L., Sadikov, A. and Cufer, T. Outcome of small cell lung cancer (SCLC) patients with brain metastases in a routine clinical setting. *Radiol Oncol* 2012; 46(1): (54-59).
- Light, W.R. Pleural effusion. Pleural disease. 2011; *Med Clin North Am* 2011; 95(6): (1055-1070).
- Light, W.R. The Undiagnosed Pleural. Effusion. *Clin Chest Med.* 2006; 27: (309-319).

- Matthew, G., Heiden, V., Lewis C., Cantley, and Thompson, C.B. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009; 324 (1029–1033).
- Mayse, M.L. Non- Malignant pleural Effusions. En A. P. Fishman, Fishman's Pulmonary Diseases and disorders. Fourth edition. 2008; China : Mc GrawHill. (1487-1505).
- Mejía-Olivares, B., Valdez-López, H.G., Martínez-Delgado, I.A., Guzmán-Delgado, N.E., Castillo-Sánchez, J.F., Pinto-Arocha, A. and Rentería-Perea, A. Etiología y prevalencia del derrame pleural en la UMAE No. 34 Monterrey, Nuevo León, México. *Neumol Cir Torax*. 2013; 72: (20-24).
- Ozcarar, B., Martinez, C.H., Morice, R.C., Eapen, G.A., Ost, D., Sarkiss, M.G., Chiu, H.T. and Jimenez, C.A. Does pleural fluid appearance really matter? The relationship between fluid appearance and cytology, cell counts, and chemical laboratory measurements in pleural effusions of patients with cancer. *J Cardiothorac Surg* 2010; 63:(1-5).
- Pérez-Rodríguez, E., and Villena-Garrido, M. V. Enfermedades de la Pleura. Madrid ERGON 2003; (117-119).
- Pettersson, T., Ojala, K. and Weber, T.H. Diagnostic significance of pleural fluid lactate concentrations. *Infection*. 1985; 13: (257-259).
- Pieter, A.J., van den Heuvel, Jing J., Wooster, R.F and Bachman, K.E. Analysis of glutamine dependency in non-small cell lung cancer: GLS1 splice variant GAC is essential for cancer cell growth. *Cancer Biol Ther*. 2012; 12 (1185-1194).
- Pinheiro, C., Sousa, B., Albergaria, A., Paredes, J., Dufloth, R., Vieira, D., Schmitt, F. and Baltazar F. GLUT1 and CAIX expression profiles in breast cancer correlate with adverse prognostic factors and MCT1 overexpression. *Histol Histopathol*. 2011; 10 (1279-86).
- Porcel, J.M., Vives, M., Cao, G., Bielsa, S., Ruiz-González, A., Martínez-Iribarren, A. and Esquerda, A. Biomarkers of infection for the differential diagnosis of pleural effusions. *Eur Respir J*. 2009; 34: (1383–1389).
- Porcel-Pérez, J.M. Practical management of pleural effusion. *An Med Interna*. 2002; 19(4): (202-8).
- Rahman, N.M., Mishra, E.K., Davies, H.E., Davies, R.O. and Lee, C.G. Clinically important factors influencing the diagnostic measurement of pleural fluid pH and glucose. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 178: (483–490).
- Ried, M. and Hofmann, H.S. The Treatment of Pleural Carcinosis With Malignant Pleural Effusion. *Medicine*. 2013; 110(18): (313–8).
- Rodriguez, E. and Lilenbaum, R.C. Small cell lung cancer: past, present, and future. *Curr Oncol Rep*. 2010; 12(5): (327-34).

- Romero-Garcia, S., Lopez-Gonzalez, J. S., Báez-Viveros, J. L., & Prado-Garcia, D. A.-CTumor cell metabolism: an integral view. *Cancer Biology and Therapy*, 2011; 939–948.
- Ruíz-Godoy, L., Rizo, P., Sánchez, F., Osornio-Vargas A., García-Cuellar, C. and Meneses, A. Mortality due to lung cancer in Mexico. *Lung Cancer* 2010; 58(2): (184-90).
- Rzeski, W., Turski, L. and Ikonomidou, G. Glutamate antagonists limit tumor growth.. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(11): (6372-7).
- Saguil, A., Wyrick, K. and Hallgren, J. Diagnostic approach to pleural effusion. *Am Fam Physician*. 2014; 90(2): (99-104).
- Sahn, S.A., Huggins, J.T., San José, M.E., Álvarez-Dobaño, J.M. and Valdés, L. Can tuberculous pleural effusions be diagnosed by pleural fluid analysis alone? *Int J tuberc lung dis*. 2013; 17(6): (787–793).
- Shamsul, O.M., Nawaz, N. and Ahsan, H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*.2011; 351: (41-58).
- signaling
- Sosa-Juárez, A., García-Sancho, C., Sánchez-Hernández J.D., Jaime-Capetillo, M.E., Fernández-Plata, R., Martínez-Briseño, D., Torre-Bouscoulet, L. and Pérez-Padilla, R. Epidemiología del derrame pleural en el INER. *Neumol Cir Torax*. 2013; 72: (136-114).
- Spencer, E., Knowles, Jarrett, I.G., Owen, H., Filsell and Ballard J.F. Production and Utilization of Acetate in Mammals. *Biochem. J*. 1974; 142(2): 401–411.
- Tanrikulu, ., Abakay, A., Kaplan M.A., Küçüköner, M., Y., Evliyaoglu, O., Sezgi, C., Sen, H., Carkanat, A.I., Kirbas, G. A Clinical, Radiographic and Laboratory Evaluation of Prognostic Factors in 363 Patients with Malignant Pleural Mesothelioma. *Respiration*. 2010; 80:(480–487).
- Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K., Yatabe, Y., Yang, P.-C. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011; 6: (244–285).
- Warth, A., Muley, T., Meister, M., Stenzinger, A., Thomas, M., Schirmacher, P., Schnabel, P.A., Budczies, J., Hoffmann, H. and Weichert, W. The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival. *J Clin Oncol*. 2012; 30(13): (1438-1446).
- Willard, S.S. and Koochekpour, S. Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. *Int J Biol Sci*. 2013; 9(9): 948–959.

12. APÉNDICE 1

CURVAS DE CARACTERÍSTICAS DEL OPERADOR-RECEPTOR: CURVAS ROC

Una amplia gama de tests diagnósticos reportan sus resultados cuantitativamente, utilizando escalas continuas. El análisis de curvas ROC (receiver operating characteristic curve) constituye un método estadístico para determinar la exactitud diagnóstica de estos tests, siendo utilizadas con tres propósitos específicos: determinar el punto de corte de una escala continua en el que se alcanza la sensibilidad y especificidad más alta, evaluar la capacidad discriminativa del test diagnóstico, es decir, su capacidad de diferenciar sujetos sanos versus enfermos, y comparar la capacidad discriminativa de dos o más tests diagnósticos que expresan sus resultados como escalas continuas.

La determinación de la enfermedad se realiza atendiendo a una serie de valores numéricos obtenidos tras la aplicación de una prueba diagnóstico. En estos casos se considera enfermedad la posición de un valor por encima (o por debajo según el tipo de medición realizada) de un valor límite umbral que previamente se ha definido. El problema en estos casos surge cuando se desea conocer cuál es el valor límite más adecuado para obtener un resultado fiable.

Si el valor umbral se lleva demasiado hacia los valores patológicos, se está aumentando la especificidad de la prueba (reduce los falsos positivos, $2b''$), pero se reduce la sensibilidad (pues aumenta los falsos negativos, c''). Por el contrario si se lleva al límite los estados de salud aumenta la sensibilidad (reduce los falsos negativos, c''), pero a costo de reducir la especificidad (aumenta los falsos positivos, b'').

El cálculo del valor de corte crítico más adecuado en una prueba diagnóstica se realiza mediante las curvas ROC, basadas en representar la curva definida para cada posible valor límite según la sensibilidad de la prueba (S) en el eje de las ordenadas y el porcentaje de falsos positivos para la prueba ($1-E$) en el eje de las abscisas. Posteriormente, se traza una recta para unir los puntos $S=1$ y $1-E=1$. El punto donde esta recta cruza la curva constituye el "valor límite crítico más adecuado" a utilizar.

CÁLCULOS PARA LOS PARÁMETROS DIAGNOSTICO

		Enfermedad		
		Presente	Ausente	
Prueba diagnóstica	Positiva	a	b	a+b
	Negativa	c	d	c+d
		a+c	b+d	a+b+c+d

a= números de verdaderos positivos.

b= número de falsos positivos

c= número de falsos negativos.

d= número de verdaderos negativos

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{a}{a+c}$$

Probabilidad de que la prueba sea positiva en presencia de la enfermedad

$$\text{ESPECIFICIDA} = \frac{c}{b+d}$$

Probabilidad de que la prueba sea negativa en ausencia de la enfermedad

$$\text{EXACTITUD} = \frac{a+d}{a+b+c+d}$$

Probabilidad de individuos bien clasificados por la prueba.

$$\text{VPP} = \frac{a}{a+b}$$

Probabilidad de que exista enfermedad cuando la prueba es positiva.

$$\text{VPN} = \frac{d}{c+b}$$

Probabilidad de que no exista enfermedad cuando la prueba es negativo.