

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA ANGIOGÉNESIS EN LA
PATOLOGÍA PLEURAL Y SU ASOCIACIÓN
CON LOS MARCADORES DE ACTIVIDAD
NEUTROFÍLICA, EL SISTEMA DE LA
FIBRINOLISIS Y LA MATRIZ
EXTRACELULAR**

Eva Ruiz Ruiz, 2003

INTRODUCCIÓN

1. LA PLEURA : ANATOMÍA Y FISIOPATOLOGÍA

La pleura es una membrana serosa que se divide en dos hojas : la pleura visceral, que tapiza el parénquima pulmonar y las cisuras interlobares y la pleura parietal que recubre la superficie interna de la pared costal, el diafragma y el mediastino. Ambas hojas delimitan entre sí un espacio prácticamente virtual, que en condiciones normales contiene una mínima cantidad de líquido. El líquido pleural es un líquido claro de contenido proteico inferior a 1.5 gr/dl, escasa celularidad con un predominio de monocitos y escasos linfocitos, macrófagos y células mesoteliales. Su principal función es disminuir la fricción entre el pulmón y la pared torácica durante los movimientos respiratorios (1,2).

Histológicamente, la membrana pleural se compone de cuatro capas con diferentes componentes celulares y estructurales : la capa fibroelástica profunda ; la capa de tejido conectivo denso que contiene vasos sanguíneos, representados fundamentalmente por capilares, vasos linfáticos y terminaciones nerviosas ; el submesotelio o membrana basal rico en proteoglicanos y la monocapa de células mesoteliales (3) . La célula mesotelial es metabólicamente activa y capaz de responder a diferentes estímulos sintetizando colágeno y elastina, factores de crecimiento celular, citoquinas, monóxido de carbono y aumentando la permeabilidad local a proteínas. Así, las células mesoteliales pleurales son una pieza fundamental en los mecanismos de inflamación pleural (4-6).

En condiciones normales la entrada y salida de líquido del espacio pleural se mantiene en constante equilibrio. Cuando la formación de líquido

excede su reabsorción comporta la aparición de derrame pleural. La presencia de derrame pleural es un proceso patológico y por tanto requiere un estudio diagnóstico para conocer su origen y decidir una actitud terapéutica adecuada.

Se han descrito seis mecanismos como causa de derrame pleural (2,7) : aumento de la presión hidrostática de la circulación microvascular ; disminución de la presión oncótica de la circulación microvascular ; disminución de la presión del espacio pleural ; aumento de la permeabilidad vascular (mecanismo implicado en los procesos inflamatorios e infecciosos) ; bloqueo del drenaje linfático (importante en la patogenia de los derrames pleurales malignos) y filtrado de líquido desde el peritoneo.

2. PATOLOGÍA PLEURAL : EL DERRAME PLEURAL EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

El diagnóstico etiológico de un derrame pleural se establece en base a las características clínicas y la exploración física del paciente, conjuntamente con el análisis del líquido pleural: estudio bioquímico, citológico o anatomopatológico y microbiológico y las técnicas radiológicas: radiografía de tórax, ecografía torácica y tomografía computerizada (8). Pero el estudio del paciente con derrame pleural no va sólo encaminado a establecer el diagnóstico etiológico del mismo, sino también a intentar predecir las complicaciones que pueden aparecer y a instaurar una terapéutica adecuada. De aquí, la importancia de conocer la fisiopatología en la formación de los derrames pleurales y sus complicaciones y la búsqueda de nuevos marcadores que nos ayuden a instaurar un tratamiento más precoz y eficaz.

2.1 ESTUDIO DEL LÍQUIDO PLEURAL

El primer paso en la evaluación de un derrame pleural es determinar si se trata de un exudado o de un trasudado. Para ello nos basamos en la clasificación establecida por Light en 1972, que ofrece una sensibilidad del 93-100% y una especificidad del 80% (9). Un derrame pleural es un exudado si cumple uno de los siguientes criterios: índice de proteínas líquido pleural/suero $> 0,5$ o índice de lactatodeshidrogenasa (LDH) líquido pleural/suero $> 0,6$ o el valor de LDH en el líquido pleural es $> 2/3$ del límite de la normalidad en el suero. Cuando nos hallamos ante un exudado estamos obligados a continuar indagando en el diagnóstico etiológico del derrame pleural.

En la tabla 1 se muestran todas las posibilidades diagnósticas ante las que nos podemos encontrar al estudiar un derrame pleural (10). A pesar de una evaluación diagnóstica exhaustiva, aproximadamente hasta un 15-20% de los derrames pleurales quedan sin diagnosticar (11,8). En este grupo de derrames pleurales es preferible un manejo conservador y el seguimiento clínico del paciente ; la mayoría quedarán sin diagnosticar a pesar de un largo seguimiento, resolviéndose espontáneamente o evolucionando a la cronicidad ; en un pequeño porcentaje se llegará al diagnóstico etiológico (12-14).

TABLA 1. Causas de derrame pleural

1. **Derrame pleural trasudado**

- a. Insuficiencia cardíaca congestiva
- b. Cirrosis hepática
- c. Síndrome nefrótico
- d. Síndrome de la vena cava superior
- e. Urinotórax
- f. Diálisis peritoneal
- g. Glomerulonefritis
- h. Mixedema
- i. Hipoalbuminemia
- j. Tromboembolismo pulmonar
- k. Sarcoidosis

2. **Derrame pleural exudado**

a. Enfermedades neoplásicas

Metástasis
Mesotelioma
Linfoma

b. Enfermedades infecciosas

Infecciones bacterianas
Tuberculosis
Infecciones por hongos, parásitos y virus

c. Enfermedades gastrointestinales

Pancreatitis
Abscesos : subfrénico, intrahepático, esplénico
Perforación esofágica
Cirugía postabdominal
Hernia diafragmática
Esclerosis endoscópica de varices

d. Enfermedades cardíacas

Enfermedades del pericardio
Síndrome de Dressler
Postcirugía de revascularización cardíaca

e. Enfermedades ginecológicas y obstétricas

Síndrome de hiperestimulación ovárica
Endometriosis
Síndrome de Meigs
Derrame pleural postparto

f. Enfermedades sistémicas

Artritis reumatoide
Lupus eritematoso sistémico e inducido por drogas
Síndrome de Sjögren
Fiebre mediterránea familiar
Síndrome de Churg Strauss
Granulomatosis de Wegener

g. Drogas

Nitrofurantoína
Dantrolene
Metisergida
Alcaloides ergóticos
Amiodarona
Interleukina-2
Procarbacin
Methotrexate
Clozapina

h. Hemotórax

i. Quilotórax

j. Miscelánea

Tromboembolismo pulmonar
Asbestosis
Postransplante pulmonar
Postransplante de médula ósea
Síndrome de las uñas amarillas
Sarcoidosis
Uremia
Atrapamiento o atelectasia pulmonar
Radioterapia
Ahogamiento
Amiloidosis
Hematopoyesis extramedular
Síndrome del distrés respiratorio del adulto
Enfermedad de Whipple
Rotura de un quiste mediastínico
Yatrogenia

2.1.1 Marcadores bioquímicos básicos en líquido pleural

pH pleural

La medida del pH pleural es útil en el diagnóstico y el manejo de los derrames pleurales paraneumónicos y malignos (15,16). El pH se considera el mejor indicador para diferenciar entre derrames paraneumónicos complicados y no complicados, estableciendo un mejor punto de corte de 7,2 para la necesidad de drenaje pleural (15,17). Es importante tener presente que en aquellos casos en los que se sospeche un derrame pleural paraneumónico y que ocupe < 15% del hemitórax, el uso de anestesia al realizar la toracocentesis puede alterar de forma significativa los valores de pH, acidificando su valor y por tanto perdiendo el valor predictivo para complicado vs no complicado (18). En los derrames pleurales malignos, un pH < 7,2 es indicativo de mal pronóstico, sugiriendo una corta expectativa de vida y una mayor probabilidad de que la pleurodesis terapéutica sea inefectiva (16,19).

Glucosa pleural

Los niveles de glucosa pleural también son importantes en el estudio de los derrames pleurales paraneumónicos y malignos. Una concentración de glucosa < 40 mg/dl es indicativo de que el derrame pleural paraneumónico está complicado y señalaría la necesidad de colocación de drenaje pleural (20). En los derrames pleurales malignos la glucosa suele ser > 60 mg/dl, y al igual que sucede con el pH, unos niveles bajos de glucosa pueden ser indicativos de mal pronóstico (16,19).

LDH pleural

Los niveles de LDH pleural no sólo nos ayudan a distinguir entre un trasudado y un exudado, sino que también son indicativos del grado de inflamación pleural (21). Un valor de LDH > 1000 UI/L en los derrames pleurales paraneumónicos puede ser un criterio para la colocación de un drenaje pleural (20).

2.1.2 Estudios radiológicos

Radiografía de tórax

La radiografía de tórax es el primer estudio radiológico a realizar en la detección de un derrame pleural. La proyección posteroanterior y lateral de tórax tiene una sensibilidad del 67%, que se puede aumentar con el decúbito lateral, y una especificidad del 70% (22,23). Así mismo es la exploración que más se utiliza para la detección de posibles complicaciones asociadas a la práctica de la toracocentesis (24).

Ecografía torácica

La ecografía torácica es una técnica muy sensible en la detección de derrame pleural, es muy útil como guía para la realización de la toracocentesis y la colocación de drenajes pleurales y ayuda a la caracterización del derrame pleural, de manera que la presencia de material ecogénico o de septos es indicativo de colección exudativa (25-27).

Tomografía computerizada torácica

La tomografía computerizada puede mostrar anomalías pleurales en una fase más precoz y nos da información sobre las lesiones presentes en el parénquima pulmonar así como de la extensión de la patología pleural. Es la mejor técnica para discriminar entre lesiones parenquimatosas y procesos pleurales y es particularmente útil en el diagnóstico y manejo de los derrames pleurales loculados. Ayuda en la evaluación preoperatoria de técnicas toracoscópicas o de decorticación pleural y en la monitorización de la respuesta de un drenaje pleural o de la terapia fibrinolítica intrapleural en los derrames pleurales paraneumónicos (28).

2.2 PRINCIPALES CAUSAS DE DERRAME PLEURAL

2.2.1 Derrame pleural paraneumónico y empiema

Cualquier derrame pleural asociado a una infección pulmonar homolateral, ya sea una neumonía, un absceso pulmonar o bronquiectasias sobreinfectadas es un derrame pleural paraneumónico. Aproximadamente el 40% de las neumonías ingresadas desarrollan un derrame pleural concomitante, hecho que se relaciona con un aumento de la morbilidad y la mortalidad (29). El derrame pleural paraneumónico es no complicado si no está infectado y no necesita un tubo de toracostomía para su resolución; es complicado si el agente infeccioso invade el espacio pleural y requiere tubo de toracostomía y en ocasiones decorticación para su resolución. Aproximadamente el 20% de los derrames pleurales paraneumónicos evolucionan a empiema, o a la presencia macroscópica de pus (30,31). En más

del 50% de los casos los empiemas son resultado de la evolución de los derrames pleurales paraneumónicos complicados, pero algunos se asocian a procedimientos quirúrgicos, traumatismos o perforaciones esofágicas (29,30,32,33). En 1995 Light propuso una nueva clasificación de los derrames pleurales paraneumónicos y empiemas (tabla 2), de gran utilidad en la práctica clínica y como guía en la terapéutica a seguir en esta importante patología, que insistimos continua asociándose a una importante morbimortalidad (34).

TABLA 2. CLASIFICACIÓN Y TRATAMIENTO DE LOS DERRAMES PLEURALES PARANEUMÓNICOS Y EMPIEMA

Clase 1 Derrame pleural (DP) no significativo	< 10 mm en la Rx tórax en decúbito Toracocentesis no indicada
Clase 2 DP paraneumónico típico	> 10 mm en la Rx tórax en decúbito Glucosa > 40 mg/dl, pH > 7,20 Gram y cultivo de líquido pleural negativos Tratamiento antibiótico únicamente
Clase 3 DP paraneumónico complicado "borderline"	7,00<pH<7,20 y/o LDH>1000 y gluc >40 mg/dl Gram y cultivo de líquido pleural negativos Antibiótico + toracocentesis de control
Clase 4 DP paraneumónico complicado simple	PH < 7,20 y/o glucosa < 40 mg/dl y/o Gram o cultivo de líquido pleural positivos Ni pus macroscópico ni loculaciones Antibiótico + tubo de toracostomía
Clase 5 DP paraneumónico complicado complejo	PH < 7,20 y/o glucosa < 40 mg/dl y/o Gram o cultivo de líquido pleural positivos Multiloculado No pus Antibiótico+tubo de toracostomía+fibrinolíticos
Clase 6 Empiema simple	Pus macroscópico Loculación única Tubo de toracostomía + fibrinolíticos y en ocasiones requiere decorticación
Clase 7 Empiema complejo	Pus macroscópico Multiloculado Tubo de toracostomía + fibrinolíticos. Con frecuencia requiere decorticación

2.2.2 Derrame pleural tuberculoso

El derrame pleural tuberculoso ocurre en aproximadamente un 30% de los pacientes con tuberculosis (35). Menos del 40% de los pacientes con pleuritis tuberculosa presentan cultivo positivo, y de ahí la utilidad de otros marcadores diagnósticos de tuberculosis. En la actualidad, en los países como el nuestro con elevada prevalencia de tuberculosis, se acepta que un derrame pleural exudado de predominio linfocitario con cifras de adenosindeaminasa (ADA) superiores a 43 U/L en un contexto clínico apropiado y buena respuesta al tratamiento específico se trata de un derrame pleural tuberculoso. Otro marcador de interés en el diagnóstico de la pleuritis tuberculosa es el interferon gamma (INF- γ) (35-37).

La pleuritis tuberculosa se suele observar como una primoinfección y como resultado de la rotura de un foco caseoso subpleural dentro del espacio pleural, aunque puede ocurrir en cualquier estadio de la infección activa, pudiendo verse también asociado a la reactivación de la tuberculosis (enfermedad postprimaria) y más raramente ser consecuencia de una diseminación hematógica o por contiguidad a partir de la enfermedad primaria pulmonar (35,38,39). De este tipo de derrame pleural es importante tener presente que si bien puede resolverse espontáneamente, un tercio de los pacientes no tratados desarrollarán posteriormente una forma más agresiva de tuberculosis (40) y que a pesar de disponer de un tratamiento eficaz es frecuente observar complicaciones en forma de engrosamiento pleural residual (41,42).

2.2.3 Derrame pleural maligno

El derrame pleural maligno representa un problema clínico común en los pacientes con patología neoplásica, siendo una de las principales causas de derrame pleural. Hasta un 5% de los casos puede tratarse de un trasudado. La pleura puede verse afectada en prácticamente todos los tipos de cáncer. El cáncer de pulmón es la principal causa, seguido del cáncer de mama. Los tumores pulmonares, de mama, ovario y estómago y los linfomas representan aproximadamente el 80% de los derrames pleurales malignos. Hablamos de derrame pleural neoplásico cuando es evidente una invasión neoplásica de la pleura demostrada por citología o estudio anatomopatológico de una muestra de biopsia pleural. El término “paraneoplásico” se reserva para aquellos casos en que el derrame pleural no parece ser resultado directo de la invasión tumoral, pero está en relación con el cáncer concomitante y no puede explicarse por otra causa. Las principales causas de derrame pleural paraneoplásico son la obstrucción linfática, la obstrucción bronquial por neumonía o atelectasia, el colapso pulmonar, por efectos sistémicos del tumor (embolia pulmonar, hipoalbuminemia) y efectos adversos a la radioterapia y a los agentes quimioterápicos (43-45).

Existen también tumores primarios de la pleura, entre los que destaca el mesotelioma pleural maligno, cuya incidencia se ve cada vez más aumentada (46).

La supervivencia media de los pacientes con derrame pleural maligno es de 6 meses y el mayor objetivo del tratamiento es paliar los síntomas, principalmente la disnea (47).

2.2.4 Derrame pleural trasudado secundario a Insuficiencia cardíaca

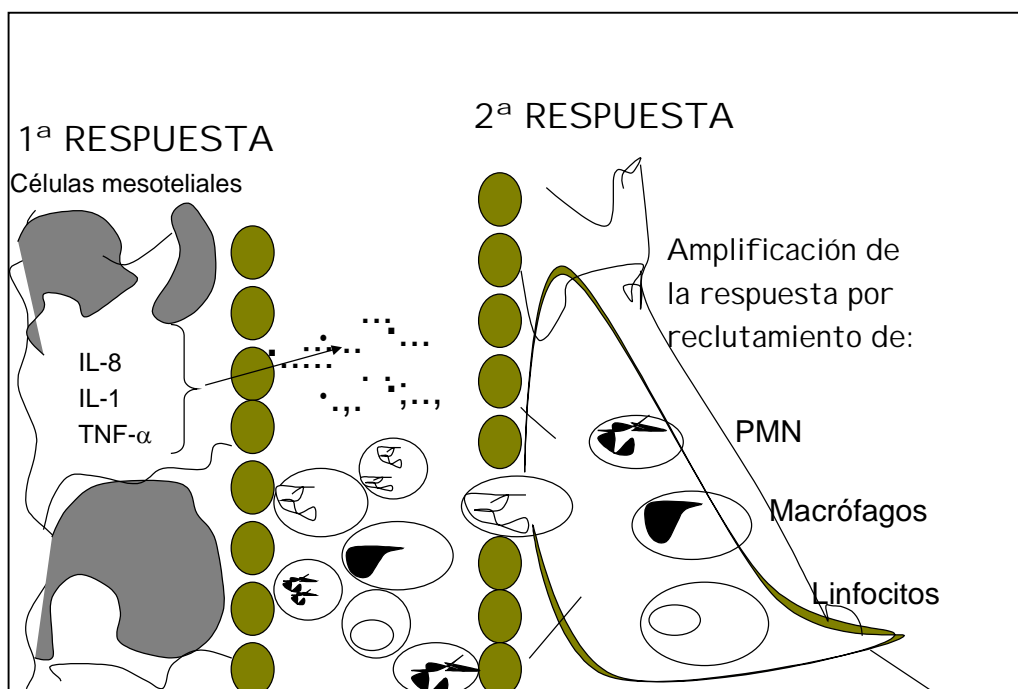
La insuficiencia cardíaca es una enfermedad de alta incidencia y representa la causa más frecuente de derrame pleural trasudado. Aproximadamente el 50% de los pacientes con insuficiencia cardíaca desarrollarán derrame pleural durante el curso de su enfermedad, que en el 88% de los casos será bilateral. Las membranas pleurales están intactas y los capilares del endotelio pleural preservan sus características normales. El acúmulo de líquido en el espacio pleural es debido a una alteración en la distribución de las presiones hidrostática y oncótica a través de la pleura (48).

3. INFLAMACIÓN E INFECCIÓN PLEURAL

Actualmente, y a pesar de los avances en el manejo diagnóstico y terapéutico de las infecciones del espacio pleural, siguen existiendo dudas sobre los mecanismos celulares y moleculares implicados en la patogenia de la inflamación pleural (4). Las infecciones y la invasión del espacio pleural en enfermedades como las neoplasias continúan siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad (47,49).

La respuesta inflamatoria pleural tiene lugar en dos fases (figura 1). La respuesta primaria o inicial está mediada por las células mesoteliales que recubren la superficie pleural, provocando la liberación y activación de mediadores inflamatorios. La respuesta secundaria consiste en la expansión y perpetuación de la respuesta inflamatoria, que estaría mediada por los mediadores inflamatorios liberados en la respuesta inicial y por las células inflamatorias reclutadas en el espacio pleural por estos mediadores (4-6).

FIGURA 1. RESPUESTA INFLAMATORIA PLEURAL

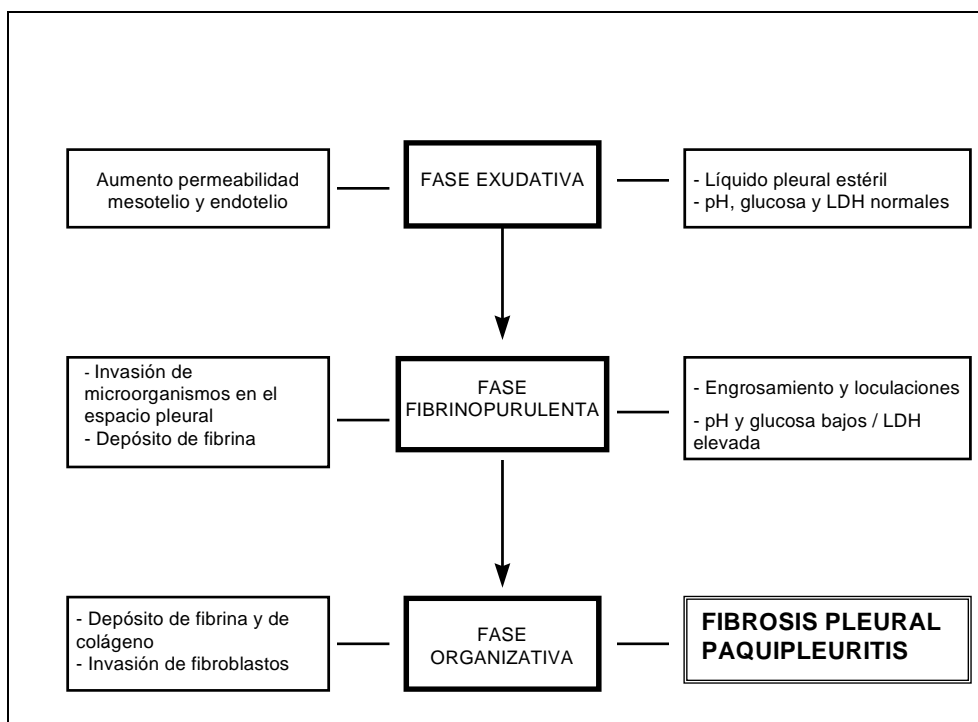


Las células mesoteliales son las primeras en reaccionar frente a una agresión pleural. Actualmente se considera que el mesotelio pleural es el principal coordinador en esta respuesta (50). Durante su activación se observa la aparición de espacios celulares o gaps que contribuyen al aumento de la permeabilidad, lo que permitirá el paso de células inflamatorias y proteínas de elevado peso molecular al espacio pleural. La activación de la célula mesotelial provoca la liberación de citoquinas, las cuales tienen un papel fundamental como mediadores de la respuesta inflamatoria en los procesos inflamatorios locales y sistémicos.

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular liberadas por un gran número de células que a su vez pueden responder a ellas, expandiendo y perpetuando la respuesta inflamatoria. Las citoquinas se han visto involucradas en procesos biológicos tan importantes como la activación y crecimiento celulares, inflamación, inmunidad y diferenciación. La liberación de citoquinas proinflamatorias favorece el reclutamiento de células inflamatorias, neutrófilos y células mononucleares fagocíticas. A su vez, la respuesta de las citoquinas proinflamatorias está controlada por las denominadas citoquinas antiinflamatorias (50-55).

Desde un punto de vista fisiopatológico se pueden distinguir tres fases o estadios en el desarrollo y evolución del líquido pleural desde un derrame infeccioso paraneumónico no complicado hasta un empiema organizado (tabla 3) (6,49,56).

TABLA 3. EVOLUCIÓN DEL DERRAME PLEURAL PARANEUMÓNICO



La primera fase es el estadio exudativo o inflamatorio, donde se produce un aumento de la permeabilidad como respuesta a la agresión pleural. Este hecho comporta el paso de líquido pleural estéril desde el intersticio pulmonar hacia el espacio celular, así como el acúmulo de células inflamatorias.

La segunda fase es el estadio fibrinopurulento o de tabicación, en el cual continua el acúmulo de líquido pleural así como un empeoramiento de la permeabilidad celular que permite la invasión bacteriana del espacio pleural. El líquido pleural es más denso, con un número elevado de polimorfonucleares, bacterias y deposición de fibrina que contribuirá a la formación de adherencias y loculaciones entre las dos hojas pleurales.

La tercera fase es el estadio final de organización/empiema, donde la activación de los factores de la coagulación con depósito de fibrina y la proliferación de fibroblastos dará lugar a la formación de membranas

inelásticas. Estas membranas, a modo de coraza, comportarán importantes secuelas anatómicas y funcionales del pulmón y la caja torácica.

En todo este proceso, desde que un líquido pleural paraneumónico en su fase inicial es estéril hasta la fase organizativa, sustancias con actividad inflamatoria parecen ser las causantes del aumento de la permeabilidad vascular del mesotelio, entre las que se podrían incluir citoquinas angiogénicas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (50).

3.1. EL NEUTRÓFILO EN LA INFLAMACIÓN PLEURAL

El neutrófilo tiene un papel clave en la respuesta inmediata del organismo ante una agresión (57). A nivel del espacio pleural, la agresión bacteriana provoca la activación de las células mesoteliales, la liberación de mediadores inflamatorios y la invasión de la cavidad pleural por los neutrófilos.

En los derrames pleurales infecciosos existe un flujo importante de neutrófilos hacia el espacio pleural especialmente en los derrames tipo empiema y paraneumónicos complicados. La función principal de los neutrófilos es la eliminación de microorganismos y detritus celulares a nivel local y paralelamente secretar proteínas y/o radicales libres que pueden lesionar la célula endotelial e inducir fibrosis pleural (58). Los derrames pleurales no infecciosos por el contrario presentan poca inflamación y están clásicamente asociados a un predominio de linfocitos (55).

Las células mesoteliales inician la respuesta inflamatoria y regulan el reclutamiento y la migración de los neutrófilos hacia el espacio pleural (5,6). En este mecanismo inflamatorio son necesarias las denominadas moléculas de adhesión, las cuales son inducidas por los mediadores inflamatorios y permiten la adhesión y posterior extravasación de los neutrófilos desde los vasos a los tejidos.

Las moléculas de adhesión median las interacciones célula/célula y célula/matriz extracelular y tienen un papel crucial en múltiples procesos biológicos de vital importancia como son la inflamación, el crecimiento tumoral y la angiogénesis. Se clasifican en tres grupos : las selectinas, las integrinas y la superfamilia de las inmunoglobulinas (59).

Las selectinas son glucoproteínas de membrana que vehiculizan el contacto inicial en las interacciones leucocito/endotelio ; se conocen 3 selectinas : selectina L, selectina P y selectina E. La interacción entre los leucocitos y el endotelio vascular se produce por la expresión de la selectina L por el neutrófilo y las selectinas P y E por las células endoteliales. Este proceso inicial se produce como respuesta a mediadores inflamatorios liberados por el endotelio como el factor activador plaquetar (PAF), el leucotrieno B4 y las citoquinas proinflamatorias (59,60).

Las integrinas, proteínas transmembrana, son los principales receptores para que las células interactúen con la matriz extracelular. Gracias a esta interacción, los neutrófilos migran en los tejidos siguiendo factores quimiotácticos producidos por las bacterias y por la destrucción celular (59,60). Adicionalmente se ha visto que las integrinas tienen un papel importante durante el proceso de angiogénesis (61).

En la superfamilia de las inmunoglobulinas destacan la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1), ambas expresadas por las células mesoteliales favoreciendo, respectivamente, la adhesión de neutrófilos y monocitos al mesotelio pleural (59,62). Asimismo, los niveles séricos de la forma soluble de ICAM-1 (sICAM-1) están elevados en múltiples procesos patológicos asociados a angiogénesis,

incluido el crecimiento tumoral, y se ha sugerido su potencial como factor angiogénico (63).

La actividad microbicida de los neutrófilos se basa en mecanismos dependientes e independientes del oxígeno (64).

Los mecanismos dependientes del oxígeno tienen lugar a través del complejo NADPH oxidasa y de la mieloperoxidasa. El sistema NADPH oxidasa es un complejo enzima de membrana que participa directamente en la generación de metabolitos oxigenados : anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radical hidroxilo (OH). La mieloperoxidasa es la enzima responsable de la actividad peroxidasa característica de los gránulos azurófilos del neutrófilo y es esencial para el mecanismo oxidativo bactericida de los fagocitos. Las concentraciones de mieloperoxidasa se han visto incrementadas en varios procesos inflamatorios. En la patología pleural, la mieloperoxidasa ha demostrado ser un buen marcador diferenciador entre derrames pleurales infecciosos y no infecciosos con valores $\geq 550 \mu\text{g/L}$ en la etiología infecciosa y ser útil en la discriminación entre derrames paraneumónicos complicados y no complicados, con un punto de corte de $3000 \mu\text{g/L}$ (65,66).

Entre los mecanismos independientes del oxígeno destacan 3 enzimas proteolíticas contenidas en los gránulos de los neutrófilos que parecen tener el mayor potencial como mediadores en la destrucción celular y el daño inmunológico : la serinproteasa elastasa y las metaloproteinasas colagenasa y gelatinasas (64).

La elastasa polimorfonuclear es una proteína de los gránulos azurófilos del neutrófilo con propiedades proteolíticas inespecíficas sobre diferentes componentes de la matriz extracelular. En la patología pleural también ha

demostrado ser un marcador diferenciador entre los derrames pleurales infecciosos y no infecciosos con un punto de corte de 300 $\mu\text{g/L}$ (67). Así mismo, las cifras pleurales de elastasa han demostrado ser útiles en el diagnóstico precoz de los derrames paraneumónicos complicados (3500 $\mu\text{g/L}$) (68).

3.2. CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS E INFLAMACIÓN PLEURAL

Las citoquinas proinflamatorias son proteínas de bajo peso molecular que se liberan de forma precoz tras la activación de las células mesoteliales en respuesta a una agresión pleural. Tienen un papel clave como mediadores de la respuesta inflamatoria local o sistémica, interviniendo en funciones como la quimiotaxis de los neutrófilos al espacio pleural y la liberación de proteasas de los gránulos azurófilos de los neutrófilos (52,55,69). Asimismo se ha observado que juegan un papel muy importante en el balance hemostático (70). En la respuesta inflamatoria pleural son fundamentales las citoquinas proinflamatorias interleuquina-8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

La IL-8 es una proteína que pertenece a la familia de las citoquinas quimiotácticas C-X-X, también conocidas como chemoquinas, siendo un elemento clave en la quimiotaxis y reclutamiento del neutrófilo en los procesos inflamatorios, inmunológicos y trombóticos (54). La IL-8 es producida por diferentes tipos celulares tales como las células mesoteliales, células endoteliales y neutrófilos entre otros, en respuesta a estímulos inflamatorios como los productos bacterianos (lipopolisacáridos), la IL-1 y el TNF- α (71-73).

A nivel pleural, el acúmulo de IL-8 es debido a la producción local y no al aumento de permeabilidad vascular, hecho que explica los niveles significativamente superiores de IL-8 en los exudados que en los trasudados y la ausencia de correlación de esta citoquina entre los niveles pleurales y los plasmáticos (74,75).

Dentro del grupo de los exudados, los derrames pleurales infecciosos presentan niveles superiores de IL-8 versus los no infecciosos, y dentro de los infecciosos los empiemas son los que presentan las cifras más elevadas. La IL-8 representa el principal factor quimiotáctico de los neutrófilos en el líquido pleural de los pacientes con empiema (76). Se ha demostrado la correlación en líquido pleural entre la IL-8 y el recuento de neutrófilos y marcadores de activación neutrofílica como la elastasa y la mieloperoxidasa, lo que sugiere un importante papel de la IL-8 en la degranulación del neutrófilo (74). A pesar de ello, algunos estudios no observan esta correlación positiva entre IL-8 y la cifra de neutrófilos y se considera que podrían existir otros factores que influyan en la quimiotaxis de los neutrófilos (77).

El TNF- α es una citoquina proinflamatoria pluripotencial producida por múltiples estirpes celulares entre las que destacan los monocitos, los macrófagos, las células mesoteliales, células endoteliales, linfocitos y neutrófilos. Es producida en respuesta a estímulos inflamatorios y en estudios experimentales se ha evidenciado que es la primera citoquina que se detecta en el foco inflamatorio, siendo la encargada de desencadenar la respuesta inflamatoria posterior, estimulando la producción de otras citoquinas como la IL-1, IL-6 e IL-8 y de activar los linfocitos T, principalmente los CD4, los neutrófilos y otras células inflamatorias (78,79).

Las cifras de TNF- α son superiores en los derrames pleurales exudados que en los trasudados, indicativo de su producción a nivel local. Dentro de los exudados, los derrames tuberculosos y los empiemas son los que presentan las cifras más altas. Asimismo, el TNF- α puede ser un parámetro discriminativo entre los exudados linfocitarios de origen tuberculoso y los de origen neoplásico (80-82).

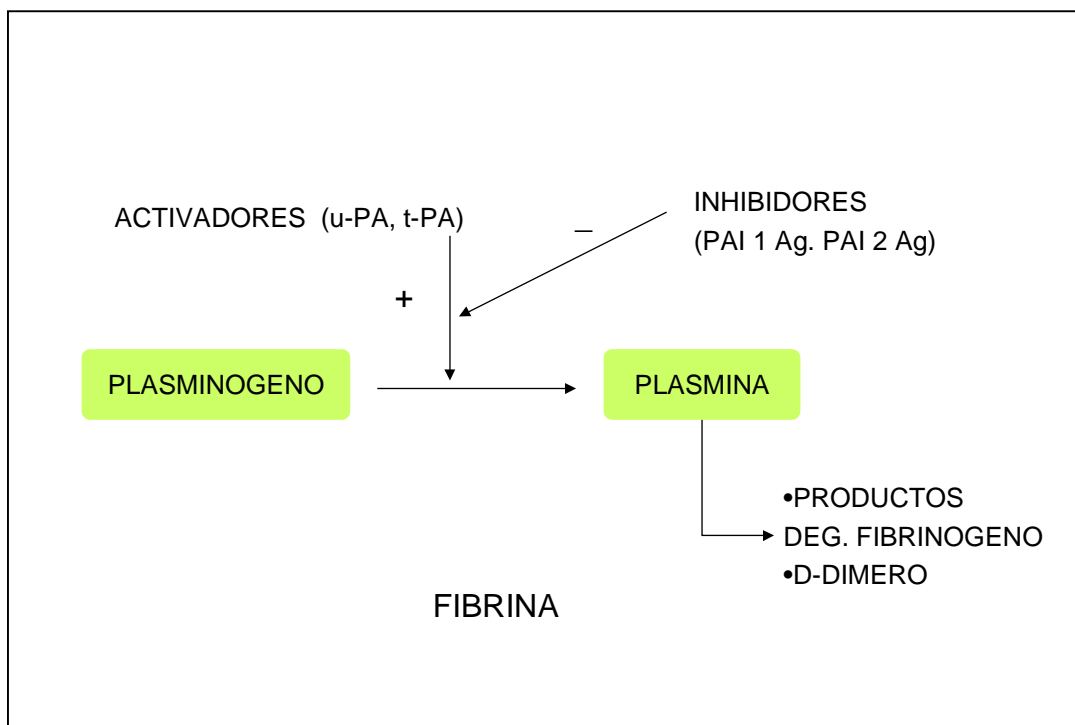
4. EL SISTEMA DE LA FIBRINOLISIS EN EL LÍQUIDO PLEURAL Y SU ASOCIACIÓN CON LOS MARCADORES INFLAMATORIOS

Los derrames pleurales paraneumónicos complicados se caracterizan por el depósito de fibrina en el espacio pleural, lo cual promueve la proliferación de fibroblastos y el depósito de colágeno. El depósito de fibrina se asocia a una alteración en la regulación de los componentes que constituyen la matriz extracelular y a una proliferación vascular que conducirá a la formación de membranas inelásticas en el estadio final organizativo y que constituye la principal complicación. Así pues podemos considerar que el depósito de fibrina es el principal estímulo para la degradación de la matriz extracelular y posterior proliferación o neoformación de vasos, sin lo cual no sería posible la fase final organizativa. La formación de adherencias, septos y loculaciones en el espacio pleural, si bien evita la extensión de la infección, dificulta el drenaje del líquido pleural y comporta importantes secuelas anatómicas y funcionales (83,84).

El depósito de fibrina depende del sistema de la coagulación, el cual a través de la formación de trombina permite convertir el fibrinógeno en polímeros de fibrina. A su vez, este sistema está controlado por el sistema de la fibrinólisis, que es el encargado de regular la degradación de la fibrina. A través del sistema de la fibrinólisis el plasminógeno inactivo se transforma en plasmina, la cual degrada la fibrina en fragmentos de bajo peso molecular. Como se puede observar en la figura 2, el sistema de la fibrinólisis está

regulado por una serie de activadores e inhibidores específicos. Entre los activadores están el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y uroquinasa activador del pasminógeno (u-PA), que estimulan la activación de plasminógeno en plasmina favoreciendo así la fibrinólisis. Entre los inhibidores están los inhibidores de los activadores del plasminógeno tipo 1 y 2 (PAI-1 y PAI-2), los cuales bloquean la acción de los activadores y por tanto inhiben la fibrinólisis. Este equilibrio en el sistema de la fibrinólisis puede romperse en determinadas patologías.

FIGURA 2. SISTEMA DE LA FIBRINOLISIS



Tal como se ha indicado con anterioridad las células mesoteliales son metabólicamente activas y capaces de responder a diferentes estímulos, siendo una pieza fundamental en los mecanismos de inflamación pleural (4-6). Estudios in vitro han demostrado que las células mesoteliales también tienen un papel importante en la formación y degradación de fibrina en el espacio pleural mediante la liberación de PAIs, y por tanto son capaces de iniciar y potenciar la formación de fibrina y de inhibir su degradación (85).

A nivel pleural, y dependiendo de la etiología del derrame pleural, puede existir un predominio en la activación de la vía de la fibrinólisis que permita la degradación de la fibrina (sería el caso de los derrames pleurales neoplásicos) o bien existir una disminución de la fibrinólisis que condicione un bloqueo en la degradación de la fibrina, hecho que podría explicar el depósito de fibrina en los derrames pleurales infecciosos (86,87).

En los derrames pleurales exudados existen niveles superiores de los inhibidores de activadores del plasminógeno (PAI-1 y PAI-2) que en los trasudados, sobretodo en aquellos de etiología inflamatoria o infecciosa (86,87).

En estudios realizados por nuestro grupo se ha observado que los niveles de PAIs en los derrames paraneumónicos están significativamente más elevados que en los exudados de origen neoplásico mientras que losempiemas presentan las cifras más bajas de t-PA (88).

En los derrames pleurales neoplásicos se han puesto de manifiesto niveles elevados de los activadores del plasminógeno (u-PA, t-PA), promoviendo la fibrinólisis y en consecuencia se trata de derrames libres sin la presencia de septos de fibrina. Sin embargo, esta actividad local proteolítica

aumentada de los factores u-PA y t-PA en los derrames malignos puede causar la degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular, lo que puede producir el paso de células tumorales al torrente vascular y en consecuencia producir la diseminación tumoral y las metástasis (89). En estudios realizados por nuestro grupo se han observado niveles más elevados de t-PA en los derrames pleurales neoplásicos que en los infecciosos (88).

Para generar una inflamación pleural en los derrames malignos que sea capaz de provocar la aparición de fibrina, es necesaria la instilación de sustancias irritantes o esclerosantes intrapleurales tales como el talco, la quinacrina o las tetraciclinas. En este hecho se basa la pleurodesis de los derrames pleurales malignos. Así mismo, los estudios realizados sobre la respuesta inflamatoria pleural asociada a la pleurodesis han demostrado que aquellos derrames en que la pleurodesis es eficaz presentan un aumento de actividad procoagulante y una inhibición de la fibrinólisis expresada por un aumento de los PAIs y por una disminución de los productos de la degradación de la fibrina. Por el contrario, en aquellos derrames en los que la pleurodesis es ineficaz se observa una persistencia de la vía de la fibrinólisis representada por niveles elevados de productos de degradación de la fibrina (90-92).

La asociación entre el sistema de la fibrinólisis y los mediadores de actividad inflamatoria ha sido ampliamente evaluada a nivel sistémico (93-95). A nivel de líquido pleural, en cambio, esta asociación ha sido poco estudiada (82,85). Nuestro grupo ha estudiado profundamente la asociación entre el sistema de la fibrinólisis y los marcadores de respuesta inflamatoria y de actividad neutrofílica en el líquido pleural (88). De los resultados obtenidos queremos destacar el hecho que en los derrames infecciosos, sobre todo en

los empiemas, existe una asociación positiva entre la elastasa polimorfonuclear y el TNF- α con los inhibidores de la actividad del plasminógeno (PAI-1 y PAI-2) y una asociación negativa entre la IL-8 y la elastasa polimorfonuclear con el activador t-PA. Así pues, los inhibidores de la degradación de la fibrina, que como hemos indicado anteriormente están aumentados en los derrames infecciosos, estarían modulados por el TNF- α y la elastasa, representando una vía de hipofibrinólisis que favorecerá el depósito de fibrina en el espacio pleural. Por el contrario, el activador de la degradación de la fibrina t-PA que estaría modulado por la elastasa y la IL-8, representa una vía de hiperfibrinólisis que está disminuida o inhibida en los derrames pleurales infecciosos.

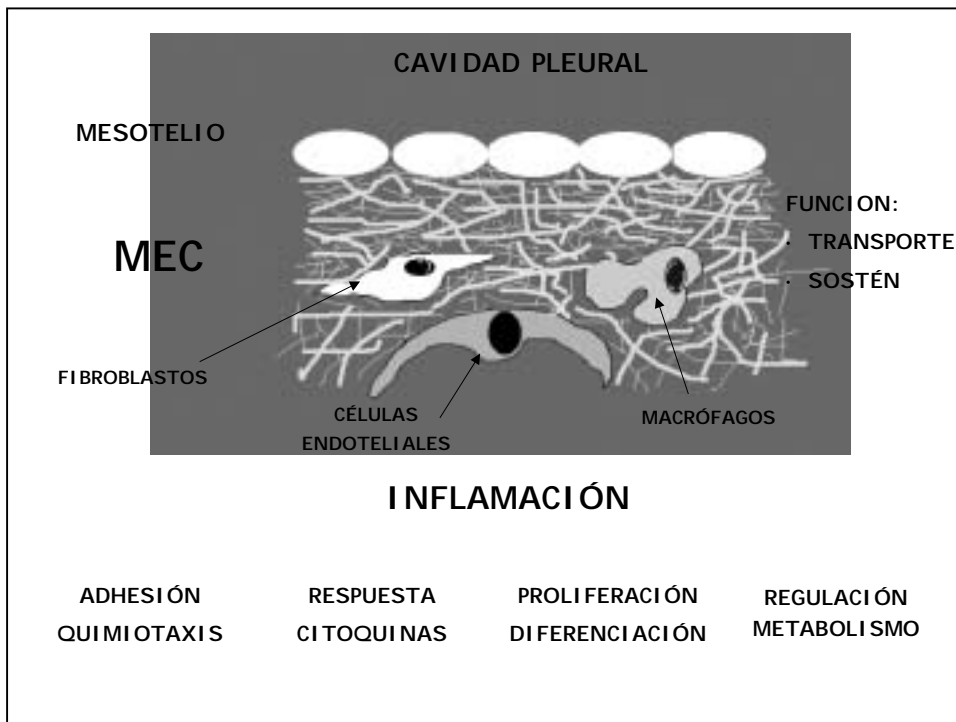
Entre los resultados obtenidos por nuestro grupo también es de gran relevancia el hecho que se han detectado diferencias significativas entre los niveles plasmáticos y pleurales de la mayoría de los parámetros implicados en la fibrinólisis en los derrames pleurales tipo exudado. Así, los niveles de dichos parámetros son significativamente más elevados en líquido pleural que en plasma, lo cual sugiere una vía de producción y liberación local como respuesta al estímulo inflamatorio, indicando una compartimentalización a nivel del espacio pleural (88).

5. LA MATRIZ EXTRACELULAR Y EL SISTEMA DE LAS METALOPROTEINASAS

La matriz extracelular y los enzimas responsables de su degradación también han demostrado tener un papel clave en los procesos inflamatorios.

La matriz extracelular está situada junto a las células mesoteliales que tapizan la superficie pleural. Está formada por un esqueleto de colágenos, proteoglicanos y glicoproteínas y no actúa como un mero elemento de transporte y sostén, sino que también está implicada en la regeneración celular, en la migración celular, en las interacciones intercelulares y como ligando de las moléculas proinflamatorias (96).

FIGURA 3. MATRIZ EXTRACELULAR



En el esqueleto de la matriz extracelular hay diferentes elementos celulares entre los que destacan los fibroblastos, los macrófagos y las células endoteliales. Los fibroblastos se encargan del mantenimiento del tejido conectivo y son capaces de proliferar ante una agresión, siendo responsables de la transformación fibrótica del tejido lesionado. Los macrófagos actúan en el remodelado de la matriz extracelular liberando citoquinas y en la degradación del tejido conectivo liberando enzimas proteolíticas y radicales tóxicos. Las células endoteliales participan activamente en el tránsito de células desde el sistema circulatorio hasta el tejido inflamado, y son capaces de proliferar ante diferentes estímulos liberados en el foco inflamatorio favoreciéndose así la angiogénesis o neoformación de vasos (96-98).

El depósito de fibrina se asocia a la proliferación de fibroblastos y a una alteración en la regulación de los componentes que constituyen la matriz extracelular. Así, podemos considerar que el depósito de fibrina es uno de los principales estímulos para la degradación de la matriz extracelular, que posteriormente conllevará la proliferación vascular. Las células mesoteliales, que como ya hemos indicado se hallan en íntimo contacto con la matriz extracelular, son capaces de actuar sobre el sistema de la fibrinolisis y participar en el depósito de fibrina, de sintetizar componentes de la matriz incluyendo los colágenos tipo I, III y IV y de participar en su degradación, tanto del colágeno como de otros componentes de la matriz. Así vemos una vez más como las células mesoteliales son un elemento fundamental en el proceso de remodelación y reparación tisular. La lesión sobre la célula mesotelial puede intensificar estos procesos de remodelación/reparación, inducir fibrosis y tener consecuencias fisiopatológicas muy negativas en el tejido afectado(99).

La formación y degradación de la matriz extracelular está regulada por proteasas y antiproteasas específicas: las metaloproteinasas (MMPs) y los inhibidores tisulares específicos de las metaloproteinasas (TIMPs) (100).

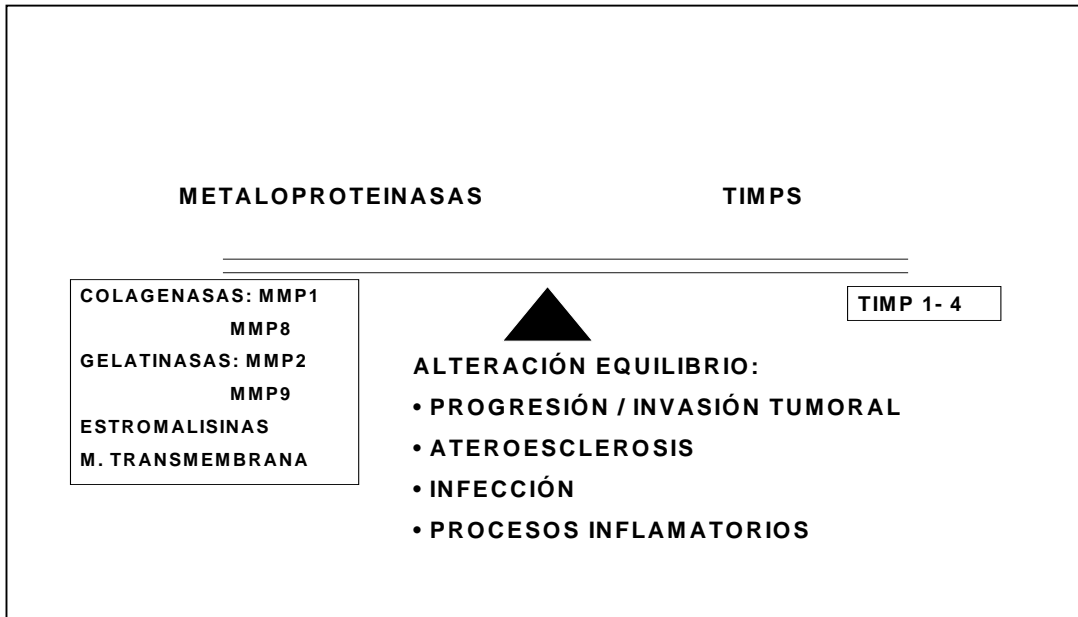
Las MMPs son una familia de proteasas de al menos 20 miembros asociadas a la degradación de la matriz extracelular, incluyendo la membrana basal, los colágenos intersticiales, la fibronectina, la laminina y varios proteoglicanos. Se caracterizan por ser endopeptidasas zinc-dependientes, por ser secretadas en forma de zimógenos inactivos (a excepción de la MMP-8 que se secreta en forma activa) y por ser inhibidas por inhibidores específicos (TIMPs). En la activación de las MMPs se han implicado la plasmina, la catepsina G y otras proteinasas (101-106).

Las MMPs se hallan en bajos niveles en los tejidos adultos sanos, pero están sobreexpresadas en procesos de remodelación tanto fisiológicos como patológicos, destacando el desarrollo embrionario, la involución postparto, la cicatrización de heridas, la reparación tisular, la inflamación, la infección, la invasión tumoral y la metástasis.

La expresión de las MMPs está fuertemente controlada por factores de crecimiento y citoquinas (101,104,105,107). La expresión anómala o el desequilibrio entre las MMPs y sus inhibidores específicos TIMPs puede causar daño tisular y de hecho se ha asociado a patologías destructivas entre las que destacan el cáncer (creando y manteniendo el microambiente que facilita el crecimiento e invasión tumorales), procesos infecciosos y sepsis, procesos inflamatorios crónicos como la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedades vasculares (aterosclerosis, aneurisma aórtico), patologías pulmonares (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfisema

pulmonar, asma, cáncer, síndrome del distres respiratorio del adulto) y enfermedades pleurales (figura 3) (105,108-113).

FIGURA 4. SISTEMA DE LAS METALOPROTEINASAS Y SUS INHIBIDORES



Hasta la actualidad se han descrito 4 subgrupos de MMPs atendiendo a su estructura y especificidad de sustrato (101,103,114) :

- 1.- **COLAGENASAS** : degradan preferentemente colágenos fibrilares tipo I, II y III. Se incluyen la MMP-1 o colagenasa intersticial, la MMP-8 o colagenasa del neutrófilo y la MMP-13. La MMP-8 está almacenada en los gránulos del neutrófilo. La MMP-1 es secretada por múltiples estirpes celulares entre las que destacan los fibroblastos, las células endoteliales y las células mesoteliales.
- 2.- **GELATINASAS** : degradan gelatina, fibronectina, colágenos de la membrana basal (tipo IV) y en menor medida colágenos fibrilares (tipos I y V). Se incluyen la MMP-2 o gelatinasa A, que es liberada por múltiples estirpes

celulares, y la MMP-9 o gelatinasa B, que además de ser liberada por diferentes tipos celulares se halla almacenada en los gránulos del neutrófilo.

3.- ESTROMALISINAS : degradan glicoproteínas y proteoglicanos. Se incluyen la MMP-3, MMP-7, MMP-10 y MMP-11.

4.- METALOPROTEINASAS TRANSMEMBRANA : degradan algunos componentes de la matriz extracelular y tienen la capacidad de activar otras MMPs. Se incluyen cinco tipos : MT-MMP-1-5.

Existen otras MMPs que no pueden clasificarse en ninguno de los grupos anteriormente descritos.

Los inhibidores específicos TIMPs controlan la actividad de las metaloproteinas. Hasta la actualidad se han descrito 4 isoformas (TIMP1-4). Los TIMP-1 y TIMP-2 inhiben todas las MMPs, y han demostrado inhibir el proceso de angiogénesis en “bioassays” (106,109).

De sumo interés es el hecho que el sistema de las MMPs también puede actuar sobre proteínas diferentes a las de la matriz extracelular, generando productos con consecuencias biológicas relevantes. Por ejemplo, la proteólisis del plasminógeno y del colágeno XVIII genera los factores anti-angiogénicos angioestatina y endostatina respectivamente (105).

5.1. EL SISTEMA DE LAS MMPs EN LA PATOGENIA DE LOS DERRAMES PLEURALES Y SU ASOCIACIÓN CON LOS MARCADORES DE ACTIVIDAD NEUTROFÍLICA Y EL SISTEMA DE LA FIBRINOLISIS EN EL ESPACIO PLEURAL

El papel de las MMPs y sus inhibidores tisulares en la patogenia de los derrames pleurales ha sido poco estudiado, y no existen referencias acerca de su asociación con los marcadores de actividad neutrofílica y el sistema de la fibrinólisis en el espacio pleural.

Revisando la literatura, estudios previos (115,116) sugieren que las metaloproteinasas pueden participar en los mecanismos inflamatorios y de alteración del sistema de la fibrinólisis que se han visto implicados en la patogenia de los derrames pleurales exudados. Otros estudios, en cambio, consideran que las MMPs y sus inhibidores tisulares en líquido pleural únicamente estarían implicados en la fisiología pleural, preservando la homeostasis y la integridad de la superficie pleural, evitando el desarrollo de adhesiones (117,118).

Numerosos estudios experimentales han estudiado la influencia de las citoquinas proinflamatorias en el sistema de las MMPs y sus inhibidores tisulares y trabajos in vitro e in vivo han demostrado la relación del sistema de la fibrinólisis con la activación de las MMPs, así como su importancia en el proceso de angiogénesis (119-122). Los trabajos realizados por nuestro grupo han puesto de manifiesto los siguientes resultados (123):

1. Los niveles de MMP-2 y TIMP-1 están elevados en todos los líquidos pleurales estudiados sin que se evidencien diferencias entre los diferentes grupos etiológicos.

2. Las concentraciones pleurales de MMP-1, MMP-8 y MMP-9 son significativamente superiores en los empiemas y derrames pleurales paraneumónicos complicados.
3. La presencia de niveles superiores de MMP-1, MMP-8 y MMP-9 en el líquido pleural respecto al plasma y la ausencia de correlación entre las concentraciones en pleura y plasma de estas metaloproteinasas en los empiemas y derrames paraneumónicos complicados, sugiere una expresión compartimentalizada de las mismas en el espacio pleural.
4. En los derrames pleurales paraneumónicos existe una asociación positiva de MMP-1, MMP-8 y MMP-9 con los marcadores de actividad neutrofílica (elastasa, IL-8, TNF-alfa) y del sistema de la fibrinólisis (u-PA, PAI-1 Antígeno) relacionados con el desarrollo de complicaciones locales en los derrames pleurales bacterianos.
5. La MMP-8 en el líquido pleural se relaciona con la presencia de complicaciones pleurales tardías en forma de paquipleuritis residual en los derrames pleurales paraneumónicos.
6. La asociación de MMP-1, MMP-8 y MMP-9 con los marcadores de activación neutrofílica y el sistema de la fibrinólisis, así como la relación de la MMP-8 con la presencia de complicaciones locales en los derrames pleurales paraneumónicos, sugiere un papel relevante de estas metaloproteinasas en la fisiopatología de los derrames pleurales paraneumónicos.

Así, consideramos que la influencia de los mediadores de la inflamación y de la fibrinólisis sobre el equilibrio de las MMPs y sus inhibidores tisulares deberían estar implicados en la patogenia de las enfermedades pleurales, y

que tanto la matriz extracelular como el sistema de las MMPs son esenciales para la proliferación vascular que caracteriza los derrames pleurales paraneumónicos complicados.

6. ANGIOGÉNESIS

6.1. CONCEPTO Y DEFINICIÓN

El concepto **angiogénesis** hace referencia a la formación de nuevos vasos sanguíneos (capilares) o neovascularización a partir de la microvasculatura preexistente. Por otra parte, el término **vasculogénesis** se refiere a la diferenciación “in situ” de células precursoras indiferenciadas (angioblastos) en células endoteliales que posteriormente se organizarán en una red vascular. La **angiogénesis fisiológica** es limitada, está estrictamente regulada y es fundamental durante la reproducción y el desarrollo embrionarios. Durante la vida postnatal y adulta, la angiogénesis es el único proceso por el cual se pueden formar nuevos vasos y está limitada a días o semanas, siendo esencial en la reparación de heridas, en el ciclo reproductivo femenino y en el músculo en ejercicio. Por el contrario, la disregulación entre los factores activadores e inhibidores en este proceso da lugar a la **angiogénesis patológica**, que suele ser persistente y comporta el crecimiento y progresión de neoplasias, procesos inflamatorios crónicos como la enfermedad de Crohn, la destrucción del cartílago en la artritis reumatoide, la ceguera en la diabetes, contribuye en el crecimiento y la hemorragia de las placas ateroscleróticas, y otros muchos procesos patológicos (124-128).

La angiogénesis tiene lugar en 4 fases (128):

- a) la fase inicial se caracteriza por un incremento de la permeabilidad a proteínas y vasodilatación.
- b) fase de progresión, donde se produce la degradación y remodelación de la matriz extracelular por parte de proteasas liberadas desde las células

endoteliales, la migración y proliferación de las células endoteliales y la interacción con las integrinas de la matriz.

c) fase de diferenciación, que incluye cambios en la morfología de las células endoteliales para alcanzar una estructura tubular o luminal.

d) fase de estabilización y maduración, caracterizada por el reclutamiento de pericitos y células musculares lisas y el depósito de nuevas proteínas de la matriz.

En todo este proceso se mantiene un estricto equilibrio entre los factores activadores e inhibidores de la angiogénesis. La ruptura de este equilibrio dará lugar a la persistencia de la neovascularización que caracteriza la angiogénesis patológica.

En la tabla 4 se recogen los principales factores angiogénicos y angiostáticos (125-128).

TABLA 4. PRINCIPALES FACTORES ACTIVADORES E INHIBIDORES DE LA ANGIOGÉNESIS

Factor activador	Mitógeno endotelial	Año y autor
Factor de crecimiento endotelial vascular	SI	Senger et al. 1983
Factor de crecimiento fibroblástico ácido	SI	Maciag et al. 1984
Factor de crecimiento fibroblástico básico	SI	Shing et al. 1984
Angiogenina	NO	Fett et al. 1985
Factor de crecimiento transformador- α	SI	Schreiber et al. 1986
Factor de crecimiento transformador- β *	NO	Roberts et al. 1986
Factor de necrosis tumoral- α *	NO	Fräter-Schröder et al. 1987
Factor endotelial derivado de las plaquetas	Síntesis de DNA	Ishikawa et al. 1989
Factor estimulador de colonias granulocítico	SI	Bussolino et al. 1991
Factor de crecimiento placentario	Débil	Maglione et al. 1991
Interleukina-8	SI	Koch et al. 1992
Proliferina	SI	Jackson et al. 1994
Factor de crecimiento hepatocítico	SI	Rosen / Bussolino et al. 1993

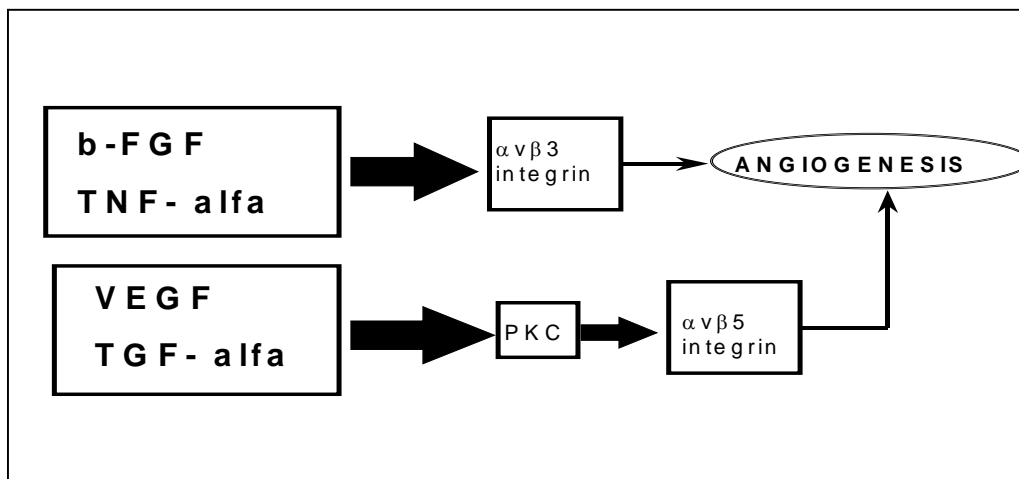
* = activadores indirectos

Factor inhibidor	Mecanismo de acción
Trombospondina-1	Modulación de la adhesión celular endotelial Inhibición del crecimiento y motilidad endoteliales
Angiostatina	Inhibición del crecimiento y motilidad de las células endoteliales
Endostatina	Inhibición del crecimiento y motilidad de las células endoteliales
Factor plaquetar 4	Inhibición del crecimiento celular endotelial y de la actividad del VEGF-A
TIMP-1	Inhibición de la motilidad de la célula endotelial
TIMP-2	Inhibición del crecimiento y motilidad de las células endoteliales
TIMP-3	Mecanismo desconocido
Interferon- α	Inhibición del crecimiento y motilidad de las células endoteliales
Factor de crecimiento transformador- β	Inhibición del crecimiento y motilidad de las células endoteliales
Prolactina (fragmento de 16 KD)	Inhibición del crecimiento y motilidad de las células endoteliales
Heparinasa	Depleción de heparan-sulfato
2-metoxiestradiol	Inhibición del crecimiento y motilidad de las células endoteliales

La vasodilatación es un paso inicial precoz en el proceso de angiogénesis, que ocurre antes del nacimiento del primer brote capilar. La vasodilatación puede inducir cambios morfológicos en las células endoteliales (“stretch” o estiramiento) haciéndolas susceptibles de responder a los factores angiogénicos, pasando de su estado de quiescencia a ser capaces de proliferar y generar neovascularización. Pero la angiogénesis no depende únicamente de los factores angiogénicos y angiostáticos y sus receptores. La angiogénesis también se ve influenciada por los procesos de remodelación de la matriz extracelular por parte de las metaloproteinasas. Las células endoteliales se unen a la matriz extracelular por medio de proteínas transmembrana o moléculas de adhesión entre las que destacan las integrinas. Esta adhesión provoca señales intracelulares que regulan la supervivencia, la proliferación y la migración celulares. La interacción entre las integrinas α_v y la matriz

extracelular se ha identificado como un sistema clave en el mantenimiento de los nuevos vasos. De hecho, se han demostrado dos vías diferentes que pueden inducir la angiogénesis: una vía activada por el factor fibroblástico básico y el TNF- α que requiere de la interacción con la integrina $\alpha_v\beta_3$ y otra vía activada por el factor de crecimiento vascular endotelial y el TGF- α que es $\alpha_v\beta_5$ dependiente y que parece actuar incrementando la protein-quinasa C (PKC) (figura 4) (61,128-132).

FIGURA 5. VIAS INDUCTORAS DE LA ANGIOGÉNESIS



En este proceso de progresión vascular también destaca el papel del factor tisular, el cual puede ser liberado por las células endoteliales tras una lesión o tras los cambios morfológicos del endotelio que se producen en el proceso de reparación (133). El factor tisular es una glicoproteína de membrana de gran capacidad procoagulante y que constituye el principal iniciador de la coagulación (134). El factor tisular está presente en la adventicia de los vasos sanguíneos sanos, funcionando como una barrera hemostática para prevenir la pérdida sanguínea, y puede ser inducido patológicamente en la membrana de múltiples células extravasculares como los fibroblastos, pericitos, monocitos y también en las células

endoteliales en respuesta a estímulos inflamatorios (70,133-136). Entre los estímulos capaces de inducir la expresión de factor tisular destacan ciertas citoquinas como la IL-1, IL-6, IL-8, y el TNF, agentes infecciosos como bacterias y virus, endotoxinas, complejos inmunológicos y la hipoxia (70,136).

El factor tisular sirve como receptor y cofactor para el factor VII de la coagulación. El complejo Factor tisular-Factor VII activa al propio factor VII, el factor X y el factor IX proporcionando la capacidad procoagulante en las superficies celulares. El resultado final es la generación de trombina y fibrina. Es importante remarcar que estudios in vivo e in vitro han demostrado que las células mesoteliales inflamadas de la pleura en los derrames pleurales exudados expresan factor tisular, no siendo así en la pleura normal; éste hecho sugiere que la expresión de factor tisular por parte de las células mesoteliales puede ser un importante iniciador de la activación intrapleural de protrombina y del depósito de fibrina que caracteriza los derrames pleurales inflamatorios (137). Por otra parte, el factor tisular ha sido identificado como un regulador de la angiogénesis, jugando un papel importante en el balance entre los factores angiogénicos y antiangiogénicos y con la capacidad de inducir la producción de VEGF; a su vez, el VEGF es capaz de inducir la producción de TF en las células endoteliales (131,138-141). Así, el factor tisular se ha involucrado en procesos como el crecimiento tumoral y procesos inflamatorios (142-146). Asimismo, el TNF, que es capaz de iniciar los procesos locales de trombosis, estimula la síntesis endotelial y la expresión de factor tisular (134).

En la fase de diferenciación las células endoteliales adquieren una estructura tubular o luminal y finalmente tiene lugar la fase de estabilización y maduración vascular que requiere el reclutamiento de pericitos, células musculares lisas y el depósito de proteínas de la matriz extracelular (128).

6.2. FACTORES ACTIVADORES E INHIBIDORES DE LA ANGIOGÉNESIS

Como hemos visto anteriormente hoy en día se reconocen muchos factores capaces de influir en la regulación del proceso de angiogénesis. Entre los factores angiogénicos destacan el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) también conocido como factor de permeabilidad vascular o vasculotropina y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF). Entre los factores angiostáticos destacan la endostatina y la trombospondina-1 (TSP-1) que pueden liberarse desde la matriz extracelular y la angiostatina que es un inhibidor endotelial circulante.

6.2.1. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

El VEGF o factor de permeabilidad vascular (VPF) o vasculotropina comprende una familia de factores de crecimiento celular que incluye el VEGF-A y sus homólogos VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y factor de crecimiento plaquetar (PGF) (147). Dentro del VEGF-A existen 5 isoformas que varían entre 121 y 209 aminoácidos: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₉. La isoforma de 165 aminoácidos es la que predomina en el pulmón y el mesotelio y es la más descrita en humanos (50,148-150).

El VEGF es una citoquina multifuncional de 34-45 KD expresada prácticamente en todas las estirpes celulares: monocitos, macrófagos, linfocitos-T, queratinocitos, células musculares lisas y fibroblastos. Los neutrófilos contienen un pool intracelular de VEGF, cuya secreción es crucial en los procesos de inflamación (151,152). La expresión del VEGF es muy limitada en los tejidos normales, pero se sobreexpresa en procesos que

implican un aumento de la permeabilidad vascular y neoformación de vasos. De hecho, el VEGF tiene dos funciones principales : 1) es un potente inductor de la permeabilidad vascular y 2) es un importante factor angiogénico, estimulando la formación de capilares a través de un efecto específico mitogénico y quimotáctico sobre las células endoteliales. La expresión de receptores para VEGF es prácticamente exclusiva de las células endoteliales vasculares ; así, a diferencia de otros factores angiogénicos, la acción proliferativa del VEGF está predominantemente restringida a las células endoteliales (148,149,153,154).

Se conocen tres receptores tirosinkinasa para la familia de VEGF: Flt-1 (VEGFR-1), KDR/Flk-1 (VEGFR-2) y Flt-4 (VEGFR-3), los cuales se expresan casi exclusivamente en las células endoteliales ; adicionalmente las células endoteliales expresan los co-receptores neuropilin-1 y neuropilin-2 que se unen selectivamente a la isoforma VEGF₁₆₅. Cada vez se conocen más tejidos que contienen receptores para el VEGF, hecho que refuerza la multifuncionalidad de esta citoquina. La pleura, tanto en su estado normal como patológico, expresa receptores para VEGF, sugiriendo un papel de esta citoquina en la fisiología y fisiopatología pleurales (148,155,156).

El VEGF ejerce sus funciones actuando directamente sobre el endotelio induciendo cambios morfológicos en las células endoteliales, alterando su expresión genética, estimulando la proliferación y migración celulares e inhibiendo la apoptosis. Además, ha demostrado su capacidad para estimular la expresión de factor tisular en monocitos y causar la quimiotaxis de estas células a través de las membranas colágenas y del endotelio, sugiriendo que puede modular la actividad procoagulante del TNF. Así pues, vemos como el

VEGF es una citoquina clave en la regulación de la permeabilidad vascular y de la angiogénesis, y que podría promover la coagulación y contribuir al depósito de fibrina (134,148,157).

Entre los factores capaces de estimular la producción de VEGF destacan la hipoxia, ciertas citoquinas y factores de crecimiento, el factor tisular (TF), los niveles bajos de pH y glucosa y el óxido nítrico.

La isquemia y la hipoxia tisulares son potentes inductores de VEGF en múltiples tejidos y estirpes celulares como el miocardio y las células pulmonares (158,159). A nivel pleural, la hipoxia parece ser importante en la inducción de VEGF en los casos de tromboembolismo pulmonar, debido a la isquemia que se produce a nivel del parénquima pulmonar (160). Los niveles bajos de pH y de glucosa, características de los derrames pleurales tipo empiema y paraneumónicos complicados, también han demostrado ser importantes inductores de VEGF(50,161).

Entre las citoquinas y otros factores capaces de inducir la expresión de VEGF destacan la IL-8, la IL-1 β , la IL-6, los factores de crecimiento fibroblástico-4 y 2 (FGF-4, FGF-2), factor derivado de las plaquetas (PDGF), factor queratinocítico (KGF), factor insulina-like-1 (IGF-1), y factor epidermoide (EGF), el factor activador de las plaquetas (PAF), el TNF- α , el TGF- α y el TGF- β (54,148,152,155,162-166).

El óxido nítrico (NO) es una molécula que sobrerregula el VEGF contribuyendo al efecto de hiperpermeabilidad y vasodilatación por parte de éste en los vasos sanguíneos. A su vez, el óxido nítrico es estimulado por el VEGF, indicando un feed-back positivo entre ambos factores (148,167).

Otras citoquinas como la IL-10 y la IL-13 pueden inhibir la liberación de VEGF (168). De la misma manera, la hiperoxia es otro inhibidor del VEGF (159).

6.2.2. Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

El FGF representa una familia de nueve factores de crecimiento polipeptídicos “heparin-binding” con capacidad de inducir los pasos necesarios para la neoformación de vasos. El FGF estimula la proliferación celular endotelial in vitro y la angiogénesis in vivo. Destacan el FGF-ácido (a-FGF) , que se encuentra limitado al tejido nervioso y el FGF-básico (b-FGF), que se halla en múltiples tejidos y es ubicuo en el endotelio, siendo elaborado por los macrófagos activados. El b-FGF es un potente mitógeno y quimotáctico para una gran variedad de estirpes celulares y es un potente estimulador de la angiogénesis actuando a diferentes niveles (169,174). Por una parte actúa en los estadios precoces de la neovascularización al inducir la síntesis de metaloproteasas como las procólagenasas y de activadores del plasminógeno (en particular del u-PA) en las células endoteliales, los cuales están implicados en la degradación de la membrana basal de la pared vascular preexistente. Por otra parte estimula la célula endotelial para migrar a través de la matriz extracelular y formar estructuras tubulares (97,124,132,169-174).

Mientras los tres receptores del VEGF se expresan prácticamente de forma exclusiva en las células endoteliales, el FGF cuenta con cuatro receptores (FGFR1-4) que se hallan ampliamente expresados (126).

6.2.3. Angiostatina

La angiostatina es un subfragmento interno de 38 Kd derivado del plasminógeno que inhibe la angiogénesis inhibiendo la proliferación celular endotelial y alterando la morfología del plasminógeno y el colágeno impidiendo la remodelación de la matriz extracelular que se requiere para la angiogénesis. En un primer momento fue identificada como un producto de las células

tumorales y puede ser detectada en la orina de los pacientes con patología maligna (128,172,173,175,176). En 1998 se demostró que este potente factor angiostático también podía estar presente en focos inflamatorios no neoplásicos (177). La formación de angiostatina a partir del plasminógeno es debida a la acción de proteasas tales como la MMP-2, MMP-7, MMP-9 y la MMP-12 o metaloelastasa de macrófagos (177).

6.2.4. Endostatina

La endostatina es el subfragmento C terminal de 20 Kd del colágeno XVIII que al parecer es liberada por la acción de las metaloproteinasas. Al igual que la angiostatina, en un primer momento fue identificada como un producto de las células tumorales (178). La endostatina inhibe la angiogénesis inhibiendo directamente la proliferación celular endotelial e impidiendo la remodelación de la matriz extracelular (128,172).

6.2.5. Trombospondina-1 (TSP-1)

La TSP-1 es un inhibidor multifuncional de la angiogénesis que modula la adhesividad de la célula endotelial, la motilidad y la actividad proteolítica impidiendo la acción de los inductores de la angiogénesis. Así, el efecto inhibidor de la TSP-1 sobre la angiogénesis ha sido demostrado tanto in vitro como in vivo (128,179-181). Pero la TSP-1 difiere de los inhibidores de la angiogénesis anteriormente descritos (angiostatina y endostatina) en dos aspectos básicos :

- 1) se encuentra en varios tejidos adultos sanos tales como el hueso, el endometrio, los ovarios y la glándula mamaria (172).

2) cada vez existen más evidencias que la TSP-1 puede ser un modulador natural de la angiogénesis, dominando una regulación positiva o negativa dependiendo del contexto y de la concentración de la misma. Por ejemplo, es capaz de activar el TGF- β , que como hemos citado anteriormente es un factor angiogénico y en presencia de colágeno tipo I la TSP-1 parece más bien facilitar que inhibir la neoformación vascular (179,182,183).

La TSP-1 es una glicoproteína trimérica de gran peso molecular liberada de los gránulos α de las plaquetas en respuesta a la estimulación por parte de la trombina y es también un componente transitorio de la matriz extracelular en el desarrollo y la reparación tisulares, siendo secretada por múltiples células de la pared vascular, incluyendo las células musculares lisas y las células endoteliales. La TSP-1 liberada por las plaquetas activadas participa en la formación y resolución del coágulo de fibrina, uniéndose a la fibrina, el plasminógeno y la uroquinasa. También participa en la respuesta inflamatoria a través de la formación de puentes entre las plaquetas y los leucocitos reclutados en el foco inflamatorio. La función de la TSP-1 en la matriz tisular es menos conocida, pero estudios in vitro sugieren que puede tener un papel genérico en la regulación de la adhesividad celular, la motilidad y la proliferación. En las células endoteliales, la TSP-1 puede inhibir la proliferación, la formación de adhesiones focales desestabilizando los contactos de la matriz extracelular, disminuir la propagación celular, inducir la apoptosis endotelial e inhibir la angiogénesis (179,182,184-186).

Entre los estímulos positivos capaces de inducir la expresión de TSP-1 destacan situaciones estresantes como la hipoxia, el producto del gen supresor tumoral p53, factores de crecimiento tales como el TGF- β , el factor de

crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el b-FGF y la progesterona a nivel del endometrio. Entre los factores capaces de inhibir la expresión de TSP-1 destacan la IL-1 β y el TNF- α (179,182,187).

6.3. ASOCIACIÓN DEL PROCESO DE ANGIOGÉNESIS CON LOS MARCADORES DE ACTIVIDAD NEUTROFÍLICA, EL SISTEMA DE LA FIBRINOLISIS, LA MATRIZ EXTRACELULAR Y LAS METALOPROTEINASAS

Tal y como hemos podido ir observando la inflamación y la angiogénesis están fuertemente relacionadas. Existe una estrecha asociación entre el neutrófilo y los marcadores de inflamación, el sistema de la fibrinólisis, la matriz extracelular, el sistema de las metaloproteinasas y el de la angiogénesis (122,173,188,189).

El neutrófilo, por sí mismo, ha demostrado ser angiogénico y contiene un pool intracelular de VEGF que es liberado en los procesos de reparación tisular y de neoformación de vasos. Los marcadores de actividad inflamatoria, como la IL-8 y el TNF-alfa han demostrado ser factores angiogénicos. La elastasa polimorfonuclear y otras proteasas derivadas del neutrófilo parecen influir de forma indirecta en la angiogénesis durante la inflamación facilitando la migración celular endotelial a través de la degradación de las membranas basales vasculares (151,152,164).

El sistema de la fibrinólisis, la matriz extracelular y el sistema de las metaloproteinasas son elementos imprescindibles para el proceso de angiogénesis y a su vez están íntimamente relacionados entre sí. El depósito de fibrina es uno de los principales estímulos para la degradación de la matriz extracelular por parte de las proteasas y posterior proliferación vascular. El u-PA y la plasmina participan en la activación de pro-MMP-2 y pro-MMP-9. Así, la degradación de la matriz extracelular requiere una cascada de elementos proteolíticos que incluiría tanto el sistema de la fibrinólisis como el de las metaloproteinasas. Como ya hemos indicado anteriormente, la degradación de la matriz extracelular es imprescindible para la neoformación de vasos (121,122,190). La distribución de MMP-2 y MMP-9 juega un papel clave en la

degradación de la matriz y ha demostrado modular la neovascularización ; adicionalmente, la MMP-9 ha demostrado estimular la liberación de VEGF desde las reservas extracelulares (162). Las MMPs, a través de la proteólisis de la matriz extracelular, permiten el inicio de la neoformación de vasos y su relación con el sistema de la fibrinólisis. Así, los activadores del plasminógeno u-PA y t-PA convertirían el plasminógeno en plasmina, que sería capaz de degradar ciertos componentes de la matriz mesangial y activaría otras proteasas que degradan la matriz tales como las gelatinasas.

A nivel pleural se ha visto como el TNF-alfa estimula la producción de MMP-1, MMP-9 y TIMPs por parte de las células mesoteliales pleurales (99). Estudios realizados por nuestro grupo en los derrames pleurales paraneumónicos (123) observan que existe una asociación positiva entre MMP-1, MMP-8 y MMP-9 y los marcadores de inflamación (elastasa polimorfonuclear, IL-8 y TNF-alfa) y el sistema de la fibrinólisis (PAIs), mientras que la MMP-2 se asocia de forma positiva con el activador del plasminógeno t-PA y de forma negativa con la elastasa y la IL-8.

Varios factores regulan la acción de las MMPs sobre la angiogénesis. Los TIMPs actuarían como angiostáticos e inhiben las acciones del efecto b-FGF. La MMP-2 promueve la formación de estructuras tubulares en los cultivos de células endoteliales y el TIMP-2 inhibe la proliferación de células endoteliales y la formación de estructuras tubulares. De la misma manera, se ha visto que el b-FGF, junto al estímulo positivo de la célula endotelial, aumenta la producción de activadores del plasminógeno y de los PAIs y activaría la proteólisis de la matriz aumentando la síntesis de colagenasas (190).

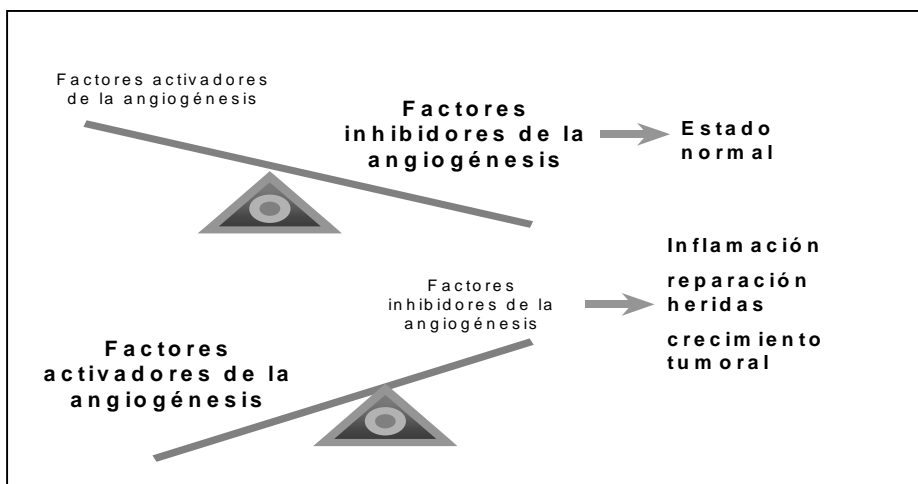
En estudios sobre cáncer de pulmón se ha demostrado que existe una asociación entre el VEGF y la disregulación del sistema de la coagulación/fibrinólisis, objetivando una correlación positiva entre los niveles

séricos de VEGF y los niveles de D-dímero y del complejo trombina-antitrombina, los cuales a su vez se correlacionan con la progresión de la enfermedad (191).

6.4. ANGIOGÉNESIS PATOLÓGICA

La correcta regulación de la angiogénesis depende de un delicado equilibrio entre los factores proangiogénicos y los angiostáticos (figura 5) (135). En condiciones normales la balanza se declina a favor de la inhibición de la angiogénesis y en consecuencia el crecimiento vascular es restringido. La disregulación entre estos factores activadores e inhibidores da lugar a la angiogénesis patológica, que suele ser persistente, y comporta importantes procesos patológicos (124-128,172).

FIGURA 6. SISTEMA DE LA ANGIOGÉNESIS



Entre las patologías donde se ha visto involucrada la disregulación del sistema de la angiogénesis destacan (122,162,188,192-198):

- el crecimiento e invasión tumorales
- la destrucción del cartílago en la artritis reumatoide
- enfermedades inflamatorias crónicas como el asma, la bronquitis crónica, la enfermedad de Crohn o la esclerosis sistémica, entre otras
- la retinopatía proliferativa que causa ceguera en la diabetes mellitus
- el síndrome de hiperestimulación ovárica
- el crecimiento y hemorragia de las placas ateroscleróticas
- procesos alérgicos
- el Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
- complicaciones post-transplante de células periféricas (stem cell) como la enfermedad veno-oclusiva hepática.
- Tuberculosis pulmonar activa, donde los niveles séricos de VEGF podrían ser un marcador de actividad de la enfermedad.

Donde más se ha evaluado el papel de la angiogénesis ha sido en los procesos neoplásicos y el factor más estudiado el VEGF (199); de hecho, en un primer momento el VEGF fue identificado como un producto tumoral. Posteriormente se comprobó la implicación del VEGF en otras patologías, así como la expresión de su gen en órganos adultos sanos, presentando los niveles más altos en las células epiteliales de los alveolos pulmonares, en los glomérulos renales, en el córtex adrenal y en las células miocárdicas (200).

En ciertas neoplasias, los niveles circulantes de factores angiogénicos, en particular de VEGF, han mostrado un valor pronóstico y una potencial

utilidad como marcadores para monitorizar la respuesta al tratamiento y la recidiva tumoral. Existen fuertes evidencias de la importancia que tiene el proceso de neovascularización en la patología tumoral, tanto en el crecimiento in situ como en el proceso de diseminación y de metástasis, y múltiples estudios han mostrado que la densidad de la microvasculatura se correlaciona fuertemente con el pronóstico de la enfermedad neoplásica y/o la presencia de metástasis (191,199,201-204) . En el trabajo de Matsuyama en el cáncer de pulmón (191) , además de mostrar una fuerte asociación del VEGF circulante con la progresión tumoral, destaca la demostración in vivo de la asociación del VEGF con el sistema de la coagulación-fibrinólisis, el cual también se encuentra afectado.

Con todo lo que hemos descrito hasta ahora podemos concluir que las aplicaciones clínicas del estudio del sistema de la angiogénesis va encaminada a tres aspectos básicos (125):

- 1) Aplicaciones diagnósticas y pronósticas
- 2) Estimulación terapéutica de la angiogénesis en procesos de reparación tisular
- 3) Terapia con agentes antiangiogénicos

6.4.1. Angiogénesis y patología pleural

Existen escasas referencias sobre la participación del sistema de la angiogénesis en la fisiopatología de los derrames pleurales, y la mayoría están centradas en el estudio del VEGF y en los derrames pleurales malignos (155). Por otra parte no hemos encontrado referencias previas en la literatura revisada acerca de la asociación del sistema de la angiogénesis en los

diferentes grupos de derrame pleural exudado con los marcadores de actividad neutrofílica, el sistema de la fibrinólisis, la matriz extracelular y el sistema de las metaloproteinasas.

Los factores angiogénicos como el VEGF y el b-FGF podrían estar relacionados en la fisiopatología de la inflamación pleural, pues ambos se han visto implicados en la inducción de neovascularización y permeabilidad vascular.

En estudios previos se ha observado que el b-FGF se encuentra más elevado en los derrames pleurales benignos que en los malignos, y que en el grupo de pacientes con mesotelioma maligno, los niveles elevados de b-FGF se correlacionan con mal pronóstico a través de mecanismos que parecen ser independientes del potencial angiogénico de este factor (206). Otros autores como Ishimoto (205) cuestionan el papel del b-FGF en la formación del líquido pleural.

Los estudios revisados coinciden en la importancia del VEGF en la patogenia de los derrames pleurales inflamatorios y malignos. El VEGF está significativamente más elevado en los exudados que en los trasudados y en los derrames pleurales malignos que en los benignos, pudiéndose correlacionar con la progresión tumoral y el pronóstico. En el caso del mesotelioma maligno, tumor pleural primario, se ha observado como las células neoplásicas producen niveles significativamente superiores de VEGF que las células mesoteliales normales y que expresan los receptores flt-1 y KDR, sugiriendo que el VEGF puede ser un regulador clave en el crecimiento del mesotelioma maligno comportándose como un factor de crecimiento autocrino (207,208). Dentro del grupo de los derrames pleurales infecciosos, la estimulación de este factor ante los niveles bajos de glucosa y de pH hace que sus niveles sean más elevados en el grupo de empiemas y derrames pleurales paraneumónicos complicados que en los no complicados (50,209-212).

La relación del VEGF en los diferentes grupos etiológicos de derrame pleural y su relación con otras citoquinas proinflamatorias es poco conocida. Momi (213) determina el VEGF en líquido pleural de diferentes categorías diagnósticas conjuntamente con IL-1 β , TNF- α y sICAM-1 y observan como el VEGF se correlaciona con las citoquinas proinflamatorias, especialmente en la pleuritis tuberculosa. Adicionalmente, proponen cuantificar conjuntamente el VEGF con el TNF- α es útil en la diferenciación entre derrames pleurales malignos y tuberculosos.

Parece ser que la regulación de la producción de VEGF a nivel del espacio pleural está regulada por el TGF- β , citoquina profibrótica multifuncional que estimula la proliferación celular y la angiogénesis en áreas de inflamación. El TGF- β puede ser producido por las células mesoteliales pleurales in vivo e in vitro y se ha visto correlacionado con el VEGF en diferentes categorías de exudado pleural (166,214-216).

Así pues, podemos ver como el VEGF parece ser importante en la formación de líquido pleural exudado en las patologías malignas e inflamatorias y que adicionalmente las células mesoteliales pleurales, tanto de individuos sanos como enfermos, presentan receptores para este factor de crecimiento.

La terapia con agentes antiangiogénicos que bloqueen la acción del VEGF puede ser una nueva línea de futuro en el manejo de los derrames pleurales (214,217,218).

Teniendo en cuenta todo lo que hemos comentado anteriormente, consideramos de gran interés estudiar el sistema de la angiogénesis en la fisiopatología de los derrames pleurales, tanto malignos como benignos, y su

asociación con los marcadores de actividad neutrofílica y los sistemas de la fibrinólisis y de las metaloproteinasas.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La invasión del espacio pleural y consecuente acumulación de líquido en enfermedades como las neoplasias y las infecciones es un problema clínico común y una causa importante de morbilidad y mortalidad. A pesar de ello, los mecanismos celulares y moleculares implicados en la formación de derrame pleural siguen siendo poco conocidos.

A pesar de los avances en el manejo diagnóstico, todavía existen derrames pleurales que quedan sin filiar o bien se diagnostican de forma tardía o incorrecta, lo que puede derivar en serias complicaciones, como es el caso de la fibrosis pleural en los derrames pleurales paraneumónicos.

Tanto el conocimiento de la fisiopatología como el diagnóstico precoz permitirá adecuar mejor el tratamiento, tanto paliativo en el caso de los derrames pleurales masivos recidivantes en determinadas neoplasias, como curativo.

Las citoquinas y los marcadores de actividad neutrofílica como la elastasa polimorfonuclear han demostrado ser mediadores importantes en la acumulación de líquido pleural. El sistema de la fibrinólisis, la matriz extracelular y el sistema de las metaloproteinasas se han visto implicados y relacionados entre sí en la patogenia de los derrames pleurales infecciosos. El proceso de angiogénesis o de neoformación de vasos es fundamental en la fase organizativa de la fibrosis pleural que caracteriza los derrames pleurales complicados y es necesaria para el crecimiento e invasión de los procesos malignos. La alteración del equilibrio entre los factores activadores e inhibidores de la angiogénesis da lugar a la angiogénesis patológica, que se ha visto implicada en múltiples patologías malignas e inflamatorias crónicas.

Partiendo de estos hechos, nos propusimos estudiar el papel del sistema de la angiogénesis, del equilibrio entre sus activadores e inhibidores, en la fisiopatología de los derrames pleurales, y su asociación con los marcadores de actividad neutrofílica, el sistema de la fibrinólisis, la matriz extracelular y el sistema de las metaloproteinasas. Para ello, hemos planteado los siguientes objetivos :

1. Analizar los niveles pleurales y plasmáticos de los factores activadores de la angiogénesis (VEGF total y libre, b-FGF) y de los factores inhibidores de la angiogénesis (endostatina, TSP-1) en los diferentes grupos etiológicos de derrame pleural exudado.
2. Estimar la asociación entre los factores activadores e inhibidores de la angiogénesis y los marcadores bioquímicos habituales (pH, glucosa, LDH), el recuento celular, los marcadores de actividad neutrofílica e inflamación (elastasa polimorfonuclear, IL-8, TNF- α), el sistema de la fibrinólisis (u-PA, t-PA, PAI-1 Ag, PAI-2 Ag) y el sistema de las metaloproteinasas y sus inhibidores tisulares (MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2) en las diferentes categorías de derrame pleural.
3. Estudiar la asociación entre los factores implicados en la angiogénesis y la presencia de complicaciones pleurales en forma de paquipleuritis en los derrames pleurales infecciosos.

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODO

1. PACIENTES

Desde junio de 1999 hasta junio de 2001 estudiamos 105 pacientes hospitalizados en el Hospital General Universitari Vall d'Hebron de Barcelona por la presencia de derrame pleural secundario a diversas etiologías.

Con el fin de obtener grupos homogéneos y con poder estadístico para establecer diferencias significativas, analizamos de forma consecutiva 21

líquidos pleurales de cada uno de los siguientes tipos de derrame pleural: empiemas o paraneumónicos complicados, paraneumónicos no complicados, tuberculosos, neoplásicos y trasudados secundarios a insuficiencia cardíaca.

A todos los pacientes se les realizó una historia clínica, exploración física, una radiografía de tórax de frente y perfil, pruebas analíticas en sangre y líquido pleural.

La toracocentesis se realizó de forma aséptica y bajo anestesia local (Scandinibsa®) que fue administrado con jeringa y aguja intramuscular (8 x 4 mm) o un abbocath del nº 18 o del nº 16.

El líquido pleural extraído fue procesado de forma inmediata analizándose datos de laboratorio, microbiológicos y citológicos.

El estudio de las muestras sanguíneas de cada grupo etiológico incluyó la determinación en suero de marcadores bioquímicos (pH, glucosa, lactodeshidrogenasa (LDH) y proteínas), marcadores de la inflamación (elastasa, IL-8 y TNF- α), la determinación en plasma de los parámetros del sistema de la fibrinólisis (t-PA, u-PA, PAI-1 Antígeno y PAI-2 Antígeno), parámetros del sistema de las metaloproteinasas (MMP-2 y MMP-9) y sus inhibidores tisulares (TIMP-1 y TIMP-2), activadores de la angiogénesis (b-FGF y VEGF total y libre) y sus inhibidores (endostatina y TSP-1). En sangre periférica se determinó la celularidad y el recuento diferencial de leucocitos.

En el líquido pleural se analizaron los marcadores bioquímicos (pH, glucosa, proteínas, adenosindeaminasa (ADA) y LDH), el recuento celular, los mediadores de la inflamación (elastasa, IL-8 y TNF- α), los marcadores del sistema de la fibrinólisis (t-PA, u-PA, PAI-1 Ag y PAI-2 Ag), del sistema de las metaloproteinasas (MMP-2, MMP-9, TIMP-1 y TIMP-2), activadores de la

angiogénesis (b-FGF, VEGF total y VEGF libre) y sus inhibidores (endostatina y TSP-1).

Todos los datos obtenidos fueron recogidos en un protocolo previamente diseñado (Anexo 1) y posteriormente fueron introducidos en una base de datos (Visual-dbase 5.5).

DEFINICIÓN DE LOS PACIENTES

Incluimos a 105 pacientes con derrame pleural (58 varones y 47 mujeres) con edades comprendidas entre los 18 y los 95 años. Los derrames pleurales se clasificaron en exudados o trasudados según los criterios establecidos por Light en 1972 (220).

GRUPO DE ESTUDIO

Incluimos 105 pacientes de ambos sexos de acuerdo con los siguientes criterios :

1. Veintiun pacientes con empiema pleural o derrame pleural paraneumónico complicado definido por (221):

- presencia macroscópica de pus en líquido pleural
- presencia de microorganismos en el Gram o cultivo del líquido pleural
- líquido pleural con pH < 7.2 y/o glucosa < 40 mg/dl en pacientes con

derrame pleural asociado a una infección del parénquima pulmonar.

2. Veintiun pacientes con derrame pleural paraneumónico no complicado definido por (221):

- líquido pleural con pH \geq 7.2 y glucosa \geq 40 mg/dl en pacientes con derrame pleural asociado a una infección del parénquima pulmonar.

- Gram y cultivo del líquido pleural negativos.

3.- Veintiun pacientes con derrame pleural tuberculoso definido por (36):

- cultivo en medio Löwenstein-Jensen positivo del líquido pleural o de una muestra de biopsia pleural.

- tinción de Ziehl-Neelsen positiva del líquido pleural o de una muestra de biopsia pleural.

- determinación de ADA en el líquido pleural mayor a 43 U/L en un derrame de predominio linfocitario y en un contexto clínico apropiado (clínica sugestiva, PPD positivo y respuesta correcta al tratamiento específico).

4. Veintiun pacientes con derrame pleural neoplásico definido por invasión neoplásica de la pleura demostrada por citología o estudio anatomopatológico de una muestra de biopsia pleural (222-228).

5. Veintiun pacientes con derrame pleural trasudado secundario a insuficiencia cardíaca definido según los criterios de Light (220,229):

- cociente de proteínas entre líquido pleural y suero menor a 0.5

- cociente de LDH entre líquido pleural y suero menor a 0.6

- LDH en líquido pleural menor a 2/3 del límite superior de la normalidad de la LDH en suero

2. MATERIAL Y MÉTODO

DETERMINACIONES DEL LABORATORIO

Las muestras obtenidas de suero y líquido pleural se centrifugaron a 2000 r.p.m. durante 30 minutos y a 4°C y el sobrenadante se conservó a -70° hasta su determinación.

ELASTASA POLIMORFONUCLEAR

Se ha realizado mediante un enzimoimmunoanálisis homogéneo que valora tanto la elastasa libre como la ligada a la alfa-1-inhibidor de proteasas (Método de inmunoadactivación, Merck, Darmstad, Alemania).

TNF- α

La cuantificación de TNF- α se efectuó con reactivos producidos por Innogenetics (Bélgica) y suministrados por Chromogenix (Móvaco, España). Los patrones utilizados son TNF-alfa humano recombinante estandarizado frente a la preparación de referencia 87/560 del National Biological Standard Board (NBSB). Para este método se han establecido en nuestro laboratorio el límite inferior de referencia (6 pg/mL) y la imprecisión interanálisis (CV = 12% para un valor medio de 47 pg/ml).

IL-8

Para la detección de IL-8 se utilizaron reactivos de Bender Medsystems, Viena, Austria, suministrados por Ingelheim Diagnóstica. En nuestro laboratorio dicho método posee un límite inferior de detección de 15 pg/mL y un CV interanálisis del 13% para una nivel medio de 536 pg/ml.

DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS DEL SISTEMA DE LA FIBRINOLISIS

El PAI 1 Ag, el PAI 2 Ag, el u-PA y el t-PA se determinaron por ELISA (ELISA Biopool-Suecia).

En nuestro laboratorio los límites de detección de u-PA y PAI 2 Ag fueron 0.1 ng/mL y 0.6 ng/mL respectivamente. Las concentraciones de u-PA y PAI 2 Ag por debajo del límite de detección del método fueron igualadas a 0.1 para el estudio estadístico.

DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DEL SISTEMA DE LAS METALOPROTEINASAS

Las metaloproteinasas (MMP-2 y MMP-9) y los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP-1 y TIMP-2) se determinaron por ELISA (ELISA Amersham Pharmacia Biotech). La sensibilidad de la técnica para MMP-2, MMP-9, TIMP-1 y TIMP-2 fue de 0.4 ng/ml, 0.6 ng/ml, 1.3 ng/ml, 3.0 ng/ml, respectivamente. La técnica utilizada reconoce precursores libres y complejados de la MMP-2 y MMP-9 y formas libres y complejadas de los TIMP-1 y TIMP-2.

DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE ANGIOGÉNESIS

Los factores activadores de la angiogénesis se determinaron por el método ELISA : b-FGF y VEGF total por Quantikine[®] Kit, R & D Systems y el VEGF libre por Chemicon International, INC, USA, cod.nº CYT 158. Entendemos por VEGF total (masa relativa de VEGF) la concentración total del complejo VEGF unido a su anticuerpo inhibidor (complejo inactivo) + la concentración de VEGF libre (forma activa responsable de la acción angiogénica). Los factores inhibidores de la angiogénesis endostatina y TSP-1 se determinaron por enzimoimmunoanálisis (Chemicon International, INC, USA, cod.nº CYT 158).

La sensibilidad para b-FGF, VEGF total, VEGF libre, endostatina y TSP-1 fue de 3 pg/ml, 9 pg/ml, 18.6 pg/ml, 1.95 ng/ml y 3,91 ng/ml respectivamente.

Así mismo para cada grupo etiológico se analizaron en suero marcadores bioquímicos : glucosa, proteínas y LDH, y en líquido pleural se analizaron los marcadores bioquímicos : pH, glucosa, proteínas, LDH y ADA.

Se obtuvo el número total de células mediante el contador Coulter ® S-Plus IV y todas las muestras se concentraron con una citocentrífuga (Cytospin ®) a 2000 r.p.m. durante 8 minutos. A continuación se realizó una tinción de May - Crunwald - Giemsa y se procedió al contaje manual porcentual de leucocitos.

DATOS BACTERIOLÓGICOS

Se realizaron las toracocentesis en condiciones de asepsia.

Todos los estudios microbiológicos se realizaron en el Servicio de Microbiología del Hospital Vall d'Hebron.

El líquido pleural extraído tras la toracocentesis se inculaba de forma inmediata en un vial de hemocultivo anaerobio del sistema BACTEC NR 660 (Becton Dickinson, Cockeysvill, EEUU) y en un tubo estéril (230).

El vial de hemocultivo anaerobio se incubó a 37°C con lectura diaria durante 5 días y una última lectura a los 15 días. Se realizó una nueva siembra en los medios habituales en caso de positividad de los viales.

Las muestras del tubo estéril fueron procesadas para la práctica de cultivo convencional en los medios habituales, tinción de GRAM e investigación de micobacterias.

Para la investigación de micobacterias se utilizó la tinción de auramina y la de Ziehl-Neelsen ; el cultivo se realizó en medio de Löwenstein-Jensen, incubándose las muestras durante 2 meses.

DATOS CITOLÓGICOS

El líquido pleural fue introducido en tubos vacutainer estériles que contenían K₃ EDTA (Becton Dickinson, France) .

Todas las muestras fueron procesadas por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron.

DATOS RADIOLÓGICOS

A todos los pacientes se les practicó en el momento del diagnóstico una radiografía de tórax posteroanterior y lateral, donde se valoró el tamaño y localización del derrame pleural.

La presencia de complicaciones tardías en forma de paquipleuritis se definió como aquel engrosamiento pleural ≥ 10 mm en la radiografía posteroanterior de tórax al finalizar el tratamiento.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el análisis de los datos se ha estudiado para cada variable si su distribución se ajusta a una distribución normal (a partir de la inspección del *normal probability plot*) y si se puede asumir la igualdad de las varianzas en cada uno de los grupos de análisis (se ha utilizado la prueba de Levene para la homogeneidad de las varianzas); en caso contrario se ha realizado una transformación logarítmica de la variable para ajustarla más a las condiciones anteriores.

1.- Para describir la distribución de los niveles de los activadores e inhibidores de la angiogénesis en los distintos tipos de derrame pleural se ha utilizado la mediana, los percentiles 25-75 y los valores mínimo y máximo. Estos resultados descriptivos se expresan en diferentes tablas según la etiología del derrame pleural al que pertenecen. Para cada grupo etiológico se analizan en plasma y en líquido pleural b-FGF, VEGF total, VEGF libre, endostatina y TSP-1.

2.- Para comparar la distribución de los activadores e inhibidores de la angiogénesis entre los distintos subtipos de derrame pleural se ha utilizado el análisis U de Mann-Whitney.

3.- Para comparar la distribución de los factores del sistema de la angiogénesis entre plasma y líquido pleural se ha utilizado la prueba no paramétrica de Wilcoxon.

4.- Para estudiar la existencia y el grado de asociación entre el sistema de la angiogénesis y los diferentes factores de estudio (marcadores bioquímicos habituales, sistema de la fibrinólisis y sistema de las metaloproteinasas) se ha realizado la correlación de Spearman

5.- Para estudiar la presencia de paquipleuritis y su relación con la angiogénesis se ha utilizado la U de Mann-Whitney.

El análisis se ha realizado con el programa estadístico SPSS (219).

ANEXO 1. PROTOCOLO DE RECOGIDA DE DATOS DE LOS DERRAMES PLEURALES

Nombre: _____
Registro: _____
Edad: _____ NHC: _____
Días de ingreso: _____

Etiqueta

Hábitos tóxicos: ____
(1:Ninguno; 2:Tabaco; 3:Enolismo; 4:ADVP; 5:Otros)

Enfermedades de base: ____
(1:Ninguna; 2: Diabetes Mellitus; 3: EPOC; 4: Hepatopatía; 5:2+3; 6:2+4; 7:2+3+4;
8:Insuficiencia cardiaca; 9:Insuficiencia renal; 10:Inmunosupresión no neutropénica; 11:
Neutropenia; 12:Ac. Anti-VIH; 13:SIDA; 14: Neoplasia; 15: Otras)
Contacto con asbesto: __ (1:Sí, 2:No)

Situaciones predisponentes de broncoaspiración: Higiene bucal ____
Consumo de alcohol ____ Reflujo gastroesofágico ____ Enfermedad neurológica ____
Utilización de sedantes ____ (1: Sí; 2: No)

Clínica: Fiebre ____ Tos ____ Dolor torácico ____ Síndrome tóxico ____ Insuficiencia
respiratoria ____ Febrícula ____ Sudoración nocturna ____ (1:Sí; 2:No)
Expectoración ____ (1:No; 2: Mucosa; 3: Mucopurulenta; 4: Hemoptoica)

Toma previa de antibióticos: ____ (1:No; 2:Sí). **Fármaco y dosis:**

Días de toma de antibiótico: _____

Neoplasia previa y tiempo desde el diagnóstico:
- IQ de la neoplasia previa: ____ (1:No, 2:Fin curativo, 3:Fin paliativo)
- QT de la neoplasia previa: ____ (1:No, 2:Fin curativo, 4:Fin paliativo)

Radiografía de tórax: Condensación lobar ____ (1:No, 2:Sí)
- **Localización:** ____ (1:No condensación, 2:LSD, 3:LMD, 4:LID, 5:LSI, 6:LII,7:Língula)
- **Afectación de varios lóbulos:** ____ (1:No, 2:Mismo pulmón, 3:Bilateral)
- **Cavitación:** ____ (1:No, 2:Sí) - **Patrón intersticial:** ____ (1:No, 2:Sí)
- **Tamaño del derrame pleural:** ____ (1:<1/3, 2:1/3-2/3, 3:>2/3)
- **Engrosamiento pleural:** ____ (1:No, 2:Sí) - **Loculación:** ____ (1:No, 2:Sí)
- **Derrame pleural:** ____ (1:Derecho, 2:Izquierdo, 3:Bilateral)

Ecografía torácica:
- **Hecha:** ____ (1:No, 2:Sí) - **Localización:** ____ (1:Derecha, 2:Izquierda, 3:Bilateral)
- **Cantidad:** ____ (1:Banda, 2:<2 espacios, 3:>2 espacios intercostales)

- **Morfología:** ___ (1:Anecoico, 2:complejo no septado, 3:complejo septado, 4:Ecogénico)
- **Loculación:** ___ (1:No, 2:Sí) - **Engrosamiento pleural:** ___ (1:No, 2:Sí)
- **Lesión pulmonar:** ___ (1:Consolidación, 2:Masa, 3:Absceso, 4:Otra).

Ecografía-doppler torácica:

- **Hecha:** ___ (1:No, 2:Sí) - **Patrón ecográfico: (ver código)**

Analítica en sangre periférica:

Leucocitos ___ Neutrófilos ___ Linfocitos ___ Creatinina ___ Glucosa ___
 Proteínas ___ Albúmina ___ LDH ___ pH ___ ADA ___ Elastasa ___ Mieloperoxidasa ___
 IL-8 ___ TNF-alfa ___ Oxido nítrico ___ D-Dímero ___
 TPA ___ UPA ___ PAI-1 Ag ___ PAI-2 Ag ___ PAI-Act ___ Metaloproteinasa 1 ___
 Metaloproteinasa 2 ___ Metaloproteinasa 8 ___ Metaloproteinasa 9 ___ TIMP 1 ___ TIMP 2 ___
 Procolágeno I ___ Procolágeno III ___ Colágeno IV ___
 bFGF ___ VEGF ___ TSP-1 ___

Microbiología:

Cultivo esputo ___ Hemocultivos ___
 Cultivo convencional líquido pleural ___ Cultivo frasco anaerobio ___
 (1:No hecho, 2:Negativo, 3:No valorable, 4: Neumococo, 5: H. Influenzae, 6:L. Pneumophila,
 7:E. Coli, 8:Klebsiella, 9:Pseudomonas, 10:Otras enterobacterias, 11:Estafilococo,
 12:Anaerobios, 13:Estreptococos, 14:Branhamella, 15:Hongos, 16: Otros).
 Antibiograma:
 Baciloscopia esputo ___ Cultivo en L-J ___ Baciloscopia en líquido pleural ___
 Cultivo líquido pleural en L-J ___
 (1:No hecha, 2:Negativo, 3:Positivo)

Estudio del líquido pleural:

Aspecto: ___ (1:Purulento, 2:No purulento, 3:Trasudado)
 pH ___ Glucosa ___ Proteínas ___ ADA ___ LDH ___ Elastasa ___ Mieloperoxidasa ___
 IL-8 ___ TNF-alfa ___ TPA ___ UPA ___ PAI-1 Ag ___ PAI-2 Ag ___ PAI-1 Actividad ___
 Metaloproteinasa 1 ___ Metaloproteinasa 2 ___ Metaloproteinasa 8 ___ Metaloproteinasa 9 ___
 TIMP 1 ___ TIMP 2 ___ Procolágeno I ___ Procolágeno II ___ Colágeno IV ___
 bFGF ___ VEGF ___ TSP-1 ___
 Células malignas: ___ (1:No, 2:Sí)
 Leucocitos ___ Neutrófilos ___ Linfocitos ___

Citología de esputo: ___ (1: No hecha, 2:Positiva células malignas, 3:Negativa)

Broncoscopia: ___ (1:No hecha, 2:Normal, 3:Patológica)

Biopsia pleural: ___ (1:No hecha, 2:Normal, 3:Neoplasia, 4:Granulomas TBC, 5:Otros)

Pleuroscopia: ___ (1:No hecha, 2:Normal, 3:Nódulos, 4:Tractos fibrosos, 5:Otros)

PPD: ___ (1:Negativo, 2:Positivo, 3:No hecho)

TAC torácico: ___ (1:No hecho, 2:Normal a excepción del derrame, 3:Patológico a demás del derrame)

Condensación lobar. Localización: ___ (1:No condensación, 2:LSD, 3:LMD, 4:LID, 5:LSI, 6:LII, 7:Língula) **Afectación de varios lóbulos:** ___ (1:No, 2:Mismo pulmón, 3:Bilateral)

Cavitación: ___ (1:No, 2:Sí) **Patrón intersticial:** ___ (1:No, 2:Sí) **Tamaño del derrame pleural:** ___ (1:<1/3, 2:1/3-2/3, 3:>2/3)

Engrosamiento pleural: ____ (1:No, 2:Sí) **Loculación:** ____ (1:No, 2:Sí)

Derrame pleural: ____ (1:Derecho, 2:Izquierdo, 3:Bilateral)

Captación de contraste: _____

Otras exploraciones (anotarlas): _____

Tipo de derrame pleural: ____ (1:Empiema, 2:Paraneumónico, 3:Tuberculoso, 4:Neoplásico, 5:Insuficiencia cardiaca, 6:Indeterminado, 7:Miscelánea, 8:Paraneoplásico)

Tratamiento antibiótico: ____ (1:No, 2:Sí). **Anotar pauta y días de tratamiento:** _____

Fisioterapia respiratoria: ____ (1:No, 2:Sí) **Toracocentesis repetidas:** ____ (1:No, 2:Sí) **Drenaje pleural:** ____ (1:No, 2:Sí) **Días de drenaje:** _____

Decorticación pleural: ____ (1:No, 2:Sí) **Número de días desde el inicio del cuadro y la realización de la decorticación:** _____

Drenaje quirúrgico y liberación de septos: ____ (1:No, 2:Sí)

Fibrinolíticos intrapleurales: ____ (1:No, 2:Sí) **Fibrinolítico administrado-**
Dosis-Días de duración: _____

Cantidad de líquido pleural drenado tras la administración de los fibrinolíticos: _____

Otros tratamientos: ____ (1:No, 2:Sí)

Neoplasia diagnosticada durante el ingreso: ____ (1:No, 2:Sí)

Tratamiento de la neoplasia: ____ (1:No, 2:Sí)

Neoplasia diagnosticada después del ingreso: ____ (1:No, 2:Sí)

Pleurodesis: ____ (1:No, 2:Sí con tetraciclinas, 3:Sí con talco, 4:Pleurodesis con otros productos) **Pleurodesis eficaz:** ____ (1:No, 2:Sí)

Otros tratamientos: _____

Evolución: ____ (1:Curación, 2:Paquipleuritis-Engrosamiento pleural-Loculación pleural, 3:Derrame pleural que requiere drenaje pleural crónico, 4:Derrame pleural crónico, 5:Exitus en relación con el derrame pleural, 6:Exitus en relación con la causa del derrame pleural, 7:Exitus en relación con otra causa, 8:Otros)

Rx Torax tras tratamiento médico-quirúrgico: ____ (1:Normal, 2:Paquipleuritis, 3:Persiste derrame pleural, 4:No realizada)

Ecografía torácica tras tratamiento médico-quirúrgico: ____ (1:Normal, 2:Septos, 3:Derrame pleural, 4:No realizada)

TAC torácico tras tratamiento médico-quirúrgico: ____ (1:Normal, 2:Paquipleuritis, 3:Septos, 4:2+3, 5:No realizado)

Días de supervivencia desde el diagnóstico: _____

Control posterior: ____ (1:Cerrado, 2:CCEE, 3:Perdido)

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS RESULTADOS.

COMPARACIÓN DE MEDIAS ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS DE DERRAME PLEURAL

Los resultados de los parámetros a estudio se expresan en diferentes tablas según la etiología del derrame pleural al que pertenecen.

Para cada grupo etiológico se analizan en suero marcadores bioquímicos (pH, glucosa, proteínas, y LDH) y marcadores de inflamación (elastasa, IL-8, TNF- α), en plasma se determinan los parámetros del sistema de la fibrinólisis (t-PA, u-PA, PAI-1 Ag, PAI-2 Ag), los parámetros del sistema de las metaloproteinasas (MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2), los activadores de la angiogénesis (b-FGF, VEGF total, VEGF libre) y los inhibidores de la angiogénesis (endostatina, TSP-1) y en sangre periférica la celularidad y el recuento diferencial de leucocitos. En el líquido pleural se analizan los marcadores bioquímicos (pH, glucosa, proteínas, LDH, ADA), el recuento celular, los parámetros de inflamación (elastasa, IL-8, TNF- α), los marcadores del sistema de la fibrinólisis (t-PA, u-PA, PAI-1 Ag, PAI-2 Ag), los parámetros del sistema de las metaloproteinasas (MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2), los activadores de la angiogénesis (b-FGF, VEGF total, VEGF libre) y los inhibidores de la angiogénesis (endostatina, TSP-1).

En las tablas quedan reflejados la mediana (Med), los percentiles 25 - 50 (Per 25-50) y los valores mínimo – máximo (Rango) en primera, segunda y tercera línea respectivamente.

Se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para estudiar las diferencias en los parámetros estudiados en suero, plasma, sangre periférica y líquido pleural entre los distintos tipos de derrame pleural.

Inicialmente se analizan las diferencias entre los derrames pleurales exudados y los trasudados y posteriormente las diferencias que se establecen dentro de los exudados, comparando cada grupo etiológico por separado.

Para estudiar de forma exhaustiva los activadores e inhibidores de la angiogénesis en los derrames pleurales exudados se han establecido los siguientes grupos de comparación :

En primer lugar se ha comparado el grupo de los derrames pleurales infecciosos (empiemas/paraneumónicos complicados, paraneumónicos no complicados y tuberculosos) frente los derrames pleurales no infecciosos (neoplásicos). Posteriormente se han comparado los derrames pleurales paraneumónicos (empiemas/paraneumónicos complicados y paraneumónicos no complicados) frente los neoplásicos.

Dentro del grupo de los derrames pleurales infecciosos, hemos hecho el estudio comparativo entre los derrames pleurales paraneumónicos (empiemas/paraneumónicos complicados y paraneumónicos no complicados) frente a los derrames tuberculosos y posteriormente cada subgrupo por separado.

Finalmente, y ya centrados en los derrames pleurales bacterianos paraneumónicos, hemos comparado los derrames pleurales empiematosos y paraneumónicos complicados versus los paraneumónicos no complicados.

Para estudiar las diferencias entre los niveles plasmáticos y pleurales de los activadores e inhibidores de la angiogénesis se ha utilizado la prueba no paramétrica de Wilcoxon.

1.1. RESULTADOS EN SANGRE

- **MARCADORES BIOQUÍMICOS EN SUERO (Tabla 1)**

Las cifras de glucemia en suero fueron inferiores en los pacientes con derrame pleural tuberculoso ($p < 0.001$).

La mediana de las cifras de proteínas en suero fue inferior en los pacientes con derrame pleural paraneumónico ($p = 0.017$).

Las cifras de LDH fueron más elevadas en el suero de los pacientes con derrame pleural trasudado que en aquellos con derrame pleural exudado (mediana 326,50 U/l) ($p = 0.001$).

TABLA 1. MARCADORES BIOQUÍMICOS EN SUERO

		EMPIEMA	PARANEUMÓNICO NO COMPLICADO	TUBERCULOSO	NEOPLÁSICO	TRASUDADO
GLUCOSA mg/dl	Med	108	102	81	101	105
	Per 25-75	96-144	90-136	76-100	84-156	92-194
	Rango	61-189	54-206	62-126	59-349	53-274
PROTEÍNAS g/dl	Med	6	6,2	6,65	6,3	6,7
	Per 25-75	5,5-7	5,8-7,7	6,2-7,3	5,8-6,9	6,1-7,1
	Rango	4,4-7,3	4,8-7,7	5,4-7,9	4,5-7,2	4,8-8,7
LDH U/l	Med	324	384	279	347	439
	Per 25-75	281-432	291-636	265-367	248-428	368-490
	Rango	117-703	185-2287	214-532	216-841	253-645

- **RECuento CELULAR EN SANGRE PERIFÉRICA (Tabla 2)**

La mediana del número de leucocitos (10800,00 cel/ μ l) y del recuento de neutrófilos (7900,00 cel/ μ l) en sangre periférica fueron superiores en los pacientes con exudado que en aquellos con trasudado ($p = 0.018$ y 0.027 respectivamente). Las medianas de leucocitos y del recuento de neutrófilos fueron superiores en los derrames paraneumónicos ($p < 0.001$).

TABLA 2. RECUENTO CELULAR EN SANGRE PERIFÉRICA

		EMPIEMA	PARANEUMÓNICO NO COMPLICADO	TUBERCULOSO	NEOPLÁSICO	TRASUDADO
LEUCOCITOS	Med	17200	13000	7800	8000	8000
Cel/μl	Per 25-75	11100-26900	11250-18400	6900-9900	6100-14300	6200-13000
	Rango	4800-46900	4500-25100	4200-15390	3100-23000	3000-21800
GRANULOCITO	Med	13400	9801	5120	6292	5492
Cel/μl	Per 25-75	9470-26093	7968-17296	4340-7741	3564-10880	4332-9490
	Rango	3624-43617	3555-22841	2860-12620	1209-19320	1050-20492
LINFOCITOS	Med	960	1287	1449	1188	970
Cel/μl	Per 25-75	624-2295	700-2700	883-1920	880-1872	825-1950
	Rango	268-2600	102-3900	281-2300	310-6435	436-2430

- **MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN EN SUERO (Tabla 3)**

La mediana de elastasa fue superior en los exudados con un valor de 86,50 $\mu\text{g/l}$ que en los trasudados con un valor de 56 $\mu\text{g/l}$ ($p = 0.044$). También fue superior en los paraneumónicos (mediana 110,00 $\mu\text{g/l}$) que en los tuberculosos ($p = 0.023$) y en el grupo de losempiemas y paraneumónicos complicados que en los paraneumónicos no complicados ($p = 0.001$).

La IL-8 mostró cifras superiores en los exudados con una mediana de 4,00 pg/ml que en los trasudados ($p = 0.006$). Los valores de IL-8 más elevados los mostraron los empiemas y derrames paraneumónicos complicados.

Las medianas de $\text{TNF-}\alpha$ en suero mostraron valores muy similares en los diferentes tipos de derrame pleural.

TABLA 3. MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN EN SUERO

		EMPIEMA	PARANEUMÓNICO NO COMPLICADO	TUBERCULOSO	NEOPLÁSICO	TRASUDADO
ELASTASA $\mu\text{g/l}$	Med	160,00	76,00	79,00	57,00	56
	Per 25-75	100-225	56,00-142,00	50,00-119,00	25,00-111,0	46,00-117,0
	Rango	40-712	9,00-218,00	26,00-256,00	3,00-160,00	4,00-158,00
IL – 8 pg/ml	Med	22,00	8,00	1,50	1,00	1,00
	Per 25-75	1,00-76	1,00-52,00	1,00-183,50	1,00-72,00	1,00-7,00
	Rango	1-7526	1,00-870,00	1,00-690,00	1,00-690,00	1,00-52,00
TNF - α pg/ml	Med	13,00	8,00	8,00	8,00	11,00
	Per 25-75	10-29	2,50-22,50	3,00-17,00	5,67-13,00	8,00-18,00
	Rango	2-296	1,00-30,00	1,00-55,00	3,00-22,00	3,00-22,00

• **SISTEMA DE LA FIBRINOLISIS EN PLASMA (Tabla 4)**

Las medianas de u-PA en plasma fueron similares en los diferentes grupos de derrame pleural. El t-PA, por el contrario, mostró valores significativamente más elevados en el grupo de derrames pleurales trasudados (mediana 16,30 ng/ml) que en los exudados (mediana 9,59 ng/ml) ($p < 0.001$). Dentro del grupo de los exudados, el t-PA mostró cifras superiores en los derrames pleurales paraneumónicos con una mediana de 12,78 ng/ml que en los tuberculosos con una mediana de 5,60 ng/ml ($p < 0.001$), y en los empiemas y paraneumónicos complicados que en los paraneumónicos no complicados ($p = 0.037$).

Las cifras plasmáticas de PAI-1 y PAI-2 no mostraron diferencias significativas entre exudados y trasudados.

TABLA 4. SISTEMA DE LA FIBRINOLISIS EN PLASMA

		EMPIEMA	PARANEUMÓNICO NO COMPLICADO	TUBERCULOSO	NEOPLÁSICO	TRASUDADO
u - PA ng/ml	Med	0,32	0,24	0,27	0,32	0,28
	Per 25-75	0,28-0,47	0,16-0,53	0,22-0,56	0,26-0,56	0,19-0,97
	Rango	0,15-0,88	0,00-0,65	0,00-1,36	0,00-1,27	0,00-2,12
t - PA ng/ml	Med	15,93	9,51	5,60	7,46	16,30
	Per 25-75	11,0-19,20	6,94-16,00	4,04-13,00	4,64-13,60	10,73-25,70
	Rango	6,01-26,40	3,15-35,05	0,82-14,94	1,17-18,60	6,08-50,97
PAI - 1 ng/ml	Med	53,68	41,36	57,26	45,45	39,00
	Per 25-75	40,81-83,84	23,85-69,07	27,54-77,94	27,06-103,65	34,91-61,17
	Rango	26,03-172,8	4,15-101,95	6,77-2166,00	10,92-186,81	18,99-77,52
PAI - 2 ng/ml	Med	2,17	1,12	2,09	0,93	1,73
	Per 25-75	0,67-4,17	0,10-2,61	1,07-3,11	0,00-2,23	0,59-2,77
	Rango	0,00-5,70	0,00-3,99	0,10-73,70	0,00-4,15	0,00-7,29

- **SISTEMA DE LAS METALOPROTEINASAS EN PLASMA (Tabla 5)**

La MMP-2 mostró valores más elevados en los trasudados que en los exudados (mediana 568,55 ng/ml) ($p < 0.001$). Dentro del grupo de los derrames pleurales infecciosos, tanto las medianas de MMP-2 como de MMP-9 fueron superiores en los derrames pleurales paraneumónicos (673,70 y 159,43 ng/ml respectivamente) que en los tuberculosos ($p = 0.001$ y 0.019 respectivamente).

Las medianas de los inhibidores de las metaloproteinasas, TIMP-1 y TIMP-2, fueron más elevadas en los trasudados que en los exudados (1182,20 y 75,53 ng/ml respectivamente) ($p = 0.004$ y 0.001 respectivamente). Las cifras en plasma de ambos inhibidores, TIMP-1 y TIMP-2, fueron superiores en los derrames pleurales tipo empiema y paraneumónico complicado que en los paraneumónicos no complicados ($p = 0.016$ y 0.022 respectivamente).

TABLA 5. SISTEMA DE LAS METALOPROTEINASAS EN PLASMA

		EMPIEMA	PARANEUMÓNICO NO COMPLICADO	TUBERCULOSO	NEOPLÁSICO	TRASUDADO
MMP - 2 Ng/ml	Med	714,50	627,47	451,33	497,63	1010,60
	Per 25-75	566,98-919,99	528,88-893,57	406,69-639,83	425,69-625,95	935,36-1429,8
	Rango	311,79-1398,30	409,68-1624,60	287,37-1360,3	176,2-759,77	647,45-1764,8
MMP - 9 Ng/ml	Med	208,65	128,12	75,46	179,80	99,61
	Per 25-75	112,87-464,23	82,75-443,11	45,17-227,29	42,21-311,80	35,97-306,37
	Rango	7,90-656,85	5,13-491,61	10,53-476,80	16-502,43	12,60-545,22
TIMP - 1 Ng/ml	Med	1710,10	1340,00	809,53	871,34	1535,50
	Per 25-75	1340,8-2970,8	956,8-2077,9	658,87-1104,5	789,54-1436,3	1333,1-1821,6
	Rango	813,44-4232,4	833,36-2389,4	393,33-2007,4	555,58-1783,0	973,56-2475,0
TIMP - 2 Ng/ml	Med	66,71	45,36	75,20	108,48	144,82
	Per 25-75	50,45-122,68	36,15-90,21	42,43-148,83	76,23-157,63	97,40-215,65
	Rango	29,65-723,02	27,05-169,68	28,78-196,75	58,93-242,93	36,49-335,09

- **SISTEMA DE LA ANGIOGÉNESIS EN PLASMA (Tablas 6.1, 6.2 y 6.3)**

En la tabla 6.1 se muestran los valores de las medianas, los percentiles 25-75 y el rango mínimo-máximo de los factores activadores e inhibidores de la angiogénesis según la etiología del derrame pleural. En las tablas 6.2 y 6.3 se expresa el grado de significación de la comparación de medias de los factores implicados en la angiogénesis en plasma, en los diferentes grupos.

Las cifras plasmáticas de b-FGF no mostraron diferencias significativas entre exudados y trasudados ni entre los diferentes grupos etiológicos de derrame pleural.

Las medianas de VEGF total fueron superiores en los exudados (95,79 pg/ml) que en los trasudados ($p = 0.003$). En el grupo de derrames pleurales infecciosos, tanto las medianas del VEGF total como del VEGF libre fueron superiores en losempiemas y paraneumónicos complicados que en los derrames paraneumónicos no complicados ($p = 0.036$). El VEGF libre mostró valores significativamente superiores en el grupo de los derrames pleurales paraneumónicos (42,60 pg/ml) que en el de los tuberculosos (18,60 pg/ml) ($p = 0.030$), mayoritariamente a expensas de los empiemas.

La medianana de la TSP-1 en plasma fue superior en los exudados (11250,00 ng/ml) que en los trasudados ($p = 0.010$). En el grupo de los derrames pleurales paraneumónicos fue superior en los paraneumónicos no complicados que en los empiemas ($p = 0.014$).

El factor inhibidor endostatina mostró una mediana más elevada en los trasudados que en los exudados (23,13 ng/ml) ($p < 0.001$). La mediana de la endostatina plasmática en los derrames pleurales paraneumónicos no complicados fue significativamente mayor que en los empiemas ($p = 0.024$) y que en los derrames neoplásicos ($p = 0.014$).

TABLA 6.1. SISTEMA DE LA ANGIOGÉNESIS EN PLASMA

		EMPIEMA	PARANEUMÓNICO NO COMPLICADO	TUBERCULOSO	NEOPLÁSICO	TRASUDADO
b – FGF pg/ml	Med	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
	Per 25-75	3,00-11,98	3,00-4,20	3,00-3,00	3,00-8,21	3,00-4,56
	Rango	3,00-22	3,00-15	3,00-6	3,00-51	3,00-19
VEGF total pg/ml	Med	155,16	79,78	71,49	70,01	42,60
	Per 25-75	97,43-329,5	55,63-247,71	34,32-228,48	31,11-190,75	15,4-124,47
	Rango	10,45-536	19,34-757	9,00-824	13,93-2558	9,00-318
VEGF libre pg/ml	Med	81,25	18,60	18,60	18,60	18,60
	Per 25-75	18,60-208,40	18,60-132,53	18,60-50,70	18,60-177,09	18,60-66,84
	Rango	18,60-828	18,60-558	18,60-687	18,60-4303	18,60-228
TSP – 1 ng/ml	Med	8478,30	15800,00	11200,00	14300,00	7762,20
	Per 25-75	5923,6-21700,0	9946,9-32500,0	6874,8-21100,0	9534,7-33200,0	5596,3-13600,0
	Rango	766,20-25500	5359,8-60300	3475,10-28900	5351,9-94900	250,50-30300
Endostatina ng/ml	Med	18,32	31,67	19,52	22,98	45,39
	Per 25-75	11,76-47,90	23,17-49,86	16,71-31,85	15,73-31,79	29,78-58,93
	Rango	4,89-55	13,96-78	4,85-39	6,16-43	16,18-96

TABLA 6.2. GRADO DE SIGNIFICACIÓN DE LA COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS FACTORES ACTIVADORES DE LA ANGIOGÉNESIS EN PLASMA.

	Comparación entre grupos	Significación (p)
	Exudados vs trasudados	ns
	Infecciosos vs neoplásicos	ns
	Paraneumónicos vs neoplásicos	ns
	Empiema y PNC vs neoplásicos	ns
b-FGF	PNNC vs neoplásicos	ns
(pg/ml)	Tuberculosos vs neoplásicos	ns
	Paraneumónicos vs tuberculosos	ns
	Empiema y PNC vs tuberculosos	0.042
	PNNC vs tuberculosos	ns
	Empiema y PNC vs PNNC	ns
	Exudados vs trasudados	0.003
	Infecciosos vs neoplásicos	ns
	Paraneumónicos vs neoplásicos	ns
	Empiema y PNC vs neoplásicos	ns
VEGF total	PNNC vs neoplásicos	ns
(pg/ml)	Tuberculosos vs neoplásicos	ns
	Paraneumónicos vs tuberculosos	ns
	Empiema y PNC vs tuberculosos	0.017
	PNNC vs tuberculosos	ns
	Empiema y PNC vs PNNC	0.036

	Exudados vs trasudados	ns
	Infecciosos vs neoplásicos	ns
	Paraneumónicos vs neoplásicos	ns
	Empiema y PNC vs neoplásicos	ns
	PNNC vs neoplásicos	ns
VEGF libre	Tuberculosos vs neoplásicos	ns
(pg/ml)	Paraneumónicos vs tuberculosos	0.030
	Empiema y PNC vs tuberculoso	0.003
	PNNC vs tuberculosos	ns
	Empiema y PNC vs PNNC	0.036

ns = no significativo ; Paraneumónicos : empiemas + paraneumónicos complicados + paraneumónicos no complicados ; PNC : paraneumónico complicado ; PNNC : paraneumónico no complicado

TABLA 6.3. GRADO DE SIGNIFICACIÓN DE LA COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS FACTORES INHIBIDORES DE LA ANGIOGÉNESIS EN PLASMA.

	Comparación entre grupos	Significación (p)
	Exudados vs trasudados	0.010
	Infecciosos vs neoplásicos	ns
	Paraneumónicos vs neoplásicos	ns
	Empiema y PNC vs neoplásicos	ns
TSP-1	PNNC vs neoplásicos	ns
(ng/ml)	Tuberculosos vs neoplásicos	ns
	Paraneumónicos vs tuberculosos	ns
	Empiema y PNC vs tuberculoso	ns
	PNNC vs tuberculosos	ns
	Empiema y PNC vs PNNC	0.014
	Exudados vs trasudados	<0.001
	Infecciosos vs neoplásicos	ns
	Paraneumónicos vs neoplásicos	ns
	Empiema y PNC vs neoplásicos	ns
Endostatina	PNNC vs neoplásicos	0.014
(ng/ml)	Tuberculosos vs neoplásicos	ns
	Paraneumónicos vs tuberculosos	ns
	Empiema y PNC vs tuberculoso	ns
	PNNC vs tuberculosos	0.006
	Empiema y PNC vs PNNC	0.024

1.2. RESULTADOS EN PLEURA

• MARCADORES BIOQUÍMICOS EN PLEURA (Tabla 7)

Los exudados mostraron valores de pH más bajos (7,35) que los trasudados (pH 7,45) ($p < 0.001$). Losempiemas y derrames paraneumónicos complicados presentaron la mediana inferior del pH ($p < 0.001$).

La mediana de la glucosa también fue inferior de forma significativa en los exudados (90 mg/dl) frente los trasudados ($p < 0.001$) y en los empiemas y paraneumónicos complicados frente al resto ($p < 0.001$).

La mediana de las proteínas fueron superiores en los exudados (4,60 mg/dl) que en los trasudados ($p < 0.001$). Los derrames tuberculosos mostraron cifras superiores de proteínas que el resto de exudados pleurales ($p < 0.001$).

Los valores de LDH también fueron significativamente superiores en los exudados (786,50 U/l) que en los trasudados ($p < 0.005$). Los empiemas y paraneumónicos complicados fueron los que presentaron niveles más elevados de LDH ($p < 0.001$).

Los valores de ADA fueron mayores en los exudados (27 U/L) que en los trasudados ($p < 0.001$). Los derrames pleurales tuberculosos mostraron los valores superiores de ADA ($p < 0.001$). En el grupo de paraneumónicos, los valores de ADA fueron superiores en los derrames tipo empiema y paraneumónico complicado que en los paraneumónicos no complicados ($p = 0.004$).

TABLA 7. MARCADORES BIOQUÍMICOS EN PLEURA

		EMPIEMA	PARANEUMÓNICO NO COMPLICADO	TUBERCULOSO	NEOPLÁSICO	TRASUDADO
pH	Med	6,91	7,40	7,31	7,42	7,45
	Per 25-75	6,89-7,19	7,30-7,45	7,28-7,35	7,39-7,48	7,42-7,53
	Rango	6,53-7,40	7,12-7,60	7,16-7,45	7,34-7,59	7,39-7,70
GLUCOSA mg/dl	Med	12	126	72	107	137
	Per 25-75	9-95	100-160	55-105	90-139	118-165
	Rango	3-173	10-180	28-140	58-377	96-342
PROTEÍNAS g/dl	Med	4,15	4,40	5,30	4,40	1,80
	Per 25-75	3,70-5,23	3,55-5,10	4,83-5,63	3,93-4,80	1,43-2,10
	Rango	0,80-6,00	1,70-6,10	4,00-6,20	3,40-5,90	0,50-3,00
LDH U/I	Med	3092	519	895	538	136
	Per 25-75	1863-11607	279-1132	715-1731	384-1691	99-181
	Rango	121-20229	133-2167	277-2105	157-2189	54-255
ADA U/I	Med	30	16	80	14	7
	Per 25-75	24-60	11-29	61-98	10-21	6-18
	Rango	11-69	5-89	40-120	5-30	3-21

- **RECUESTO CELULAR EN LÍQUIDO PLEURAL (Tabla 8)**

El número total de leucocitos y el recuento diferencial, tanto para granulocitos como para linfocitos, fueron superiores en los derrames pleurales exudados (3100 cel/ μ l, 819 cel/ μ l y 1324,5 cel/ μ l respectivamente) que en los trasudados ($p < 0.001$). Los derrames pleurales tipo empiema y paraneumónico complicado mostraron los valores superiores de leucocitos totales. En el recuento diferencial de los derrames infecciosos, el grupo de los paraneumónicos mostraron un predominio de granulocitos (4296 cel/ μ l ($p < 0.001$) y los tuberculosos de linfocitos.

TABLA 8. RECUESTO CELULAR EN LÍQUIDO PLEURAL

		EMPIEMA	PARANEUMÓNICO NO COMPLICADO	TUBERCULOSO	NEOPLÁSICO	TRASUDADO
LEUCOCITOS	Med	8250	4800	2500	1500	500
Cel/μl	Per 25-75	1775-67225	3100-21700	1400-7100	1000-3700	200-1100
	Rango	800-199000	100-30900	500-14700	240-12400	100-1400
GRANULOCITOS	Med	7425	2205	308	250	40
Cel/μl	Per 25-75	1636-44893	861-16275	96-2128	75-708	19-272
	Rango	400-70959	30-20394	5-5264	12-1730	2-1050
LINFOCITOS	Med	424	2232	1971	980	290
Cel/μl	Per 25-75	85-1785	800-7800	1326-5000	460-2448	160-800
	Rango	11-4494	60-10506	495-11466	198-9920	60-1100

- **MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN EN LÍQUIDO PLEURAL (Tabla 9, figuras 1, 2, 3)**

Los marcadores de inflamación estudiados (elastasa polimorfonuclear, IL-8 y TNF-alfa) mostraron una mediana significativamente superior en los exudados que en los trasudados ($p < 0.001$), con valores de 234 $\mu\text{g/l}$, 152 pg/ml y 33 pg/ml respectivamente .

Losempiemas y derrames pleurales paraneumónicos complicados mostraron las cifras más elevadas de elastasa y de IL-8 mientras que los derrames tuberculosos mostraron las cifras más altas de TNF-alfa ($p < 0.05$).

En el grupo de los derrames pleurales paraneumónicos, los tres marcadores de inflamación fueron significativamente superiores en los empiemas y paraneumónicos complicados que en los paraneumónicos no complicados ($p < 0.001$).

TABLA 9. MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN EN LÍQUIDO PLEURAL

		EMPIEMA	PARANEUMÓNICO NO COMPLICADO	TUBERCULOSO	NEOPLÁSICO	TRASUDADO
ELASTASA $\mu\text{g/l}$	Med	7286,00	175,00	297,00	32,00	7,00
	Per 25-75	4818-21236,25	67,00-1457,00	144,00-748,00	11,00-104,00	4,50-80,00
	Rango	582,00-39876,0	24,00-3325,00	8,00-1570,00	2,00-212,00	2,00-118,00
IL – 8 pg/ml	Med	7892,00	17,00	120,00	83,00	10,00
	Per 25-75	1639-46940	1,00-424,00	55,50-355,25	19,00-263,00	1,00-13,00
	Rango	538-344100	1,00-1545,00	1,00-663,00	1,00-760,00	1,00-34,00
TNF - α pg/ml	Med	89,00	16,00	135,50	14,00	6,00
	Per 25-75	33,00-705,0	7,00-35,00	97,25-218,75	9,00-24,00	3,00-16,00
	Rango	2,00-9941,0	2,00-153,00	9,00-252,00	4,00-50,00	1,00-38,00

FIGURA 1. ELASTASA EN LÍQUIDO PLEURAL

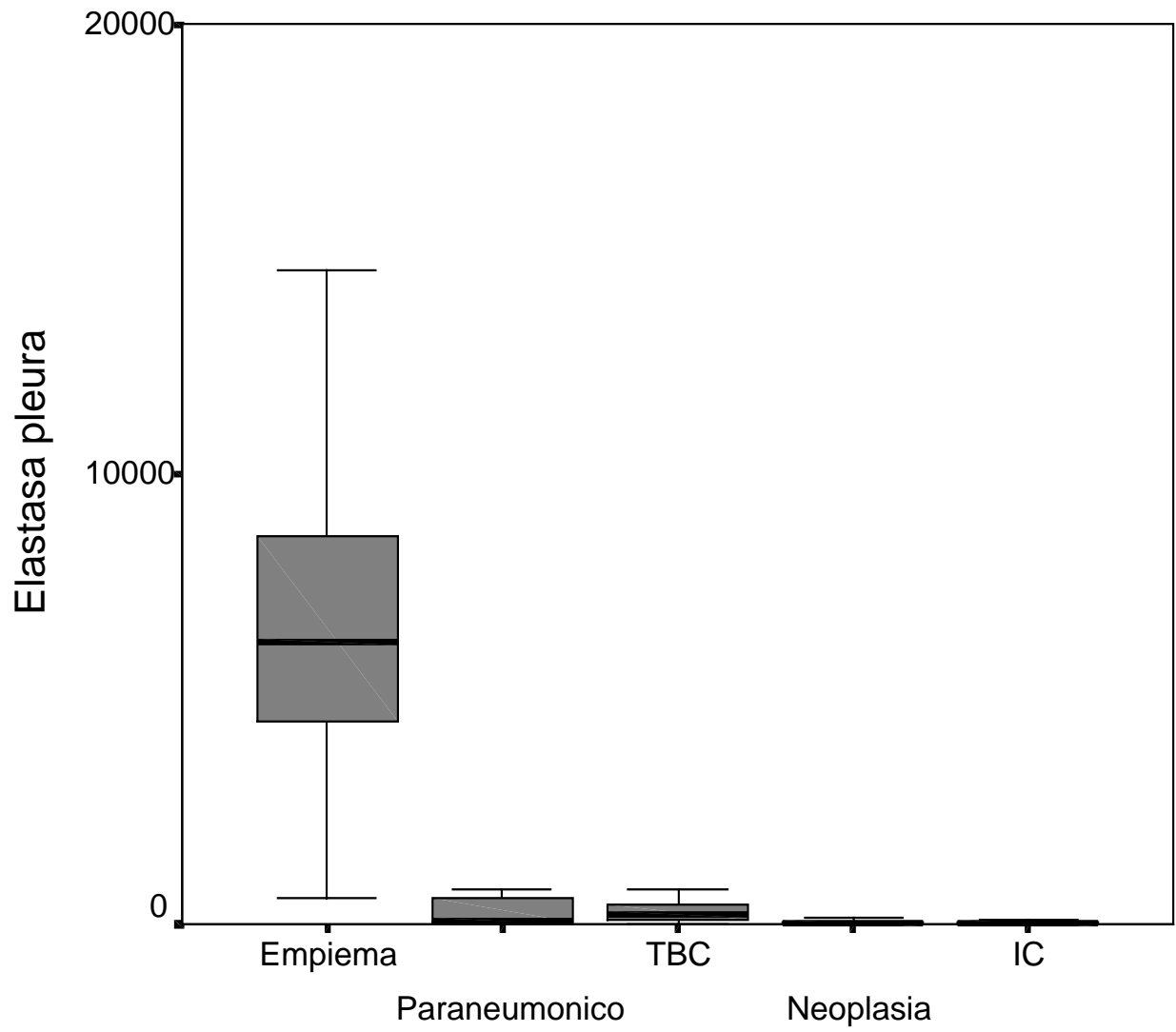


FIGURA 2. IL-8 EN LÍQUIDO PLEURAL

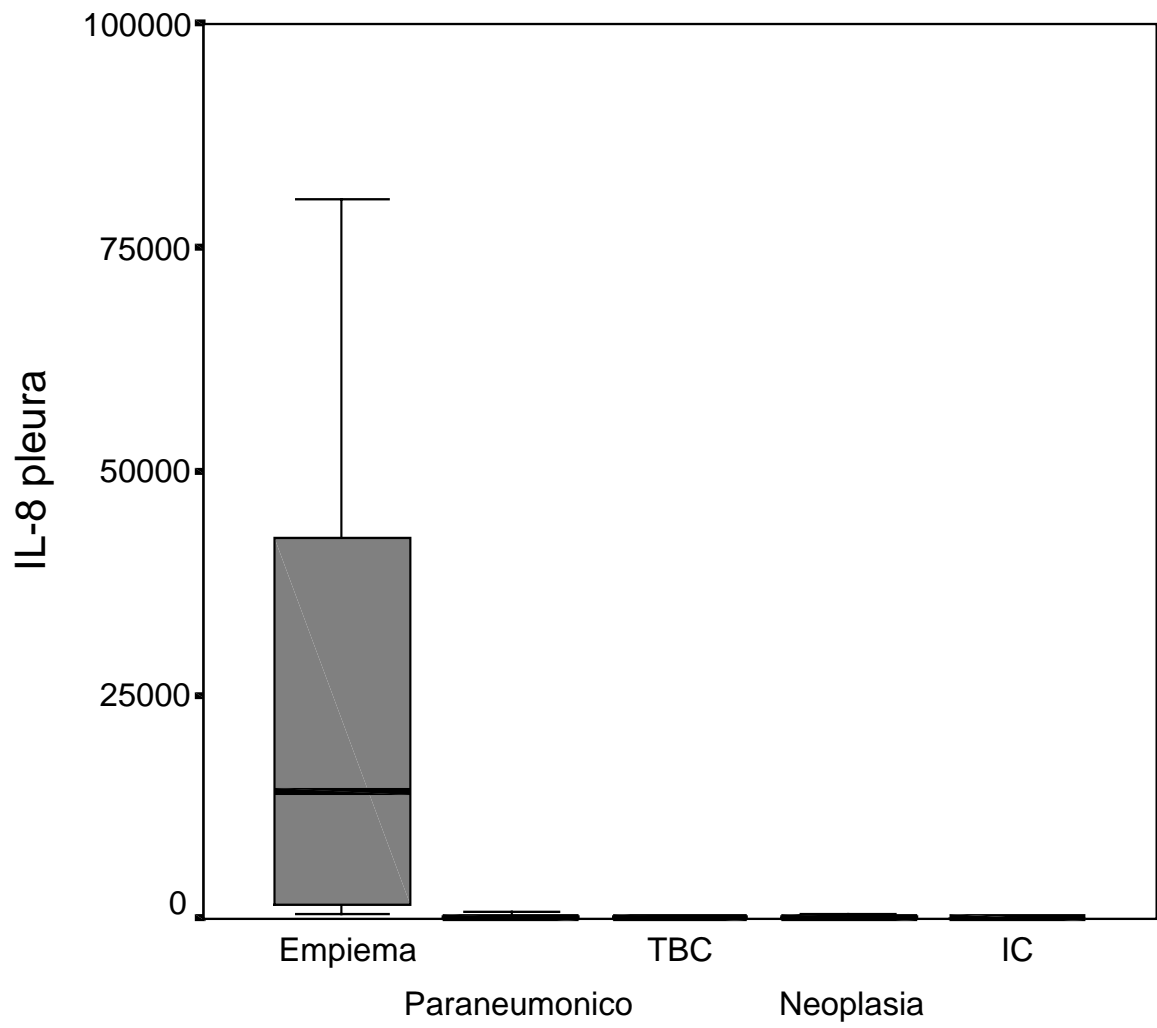
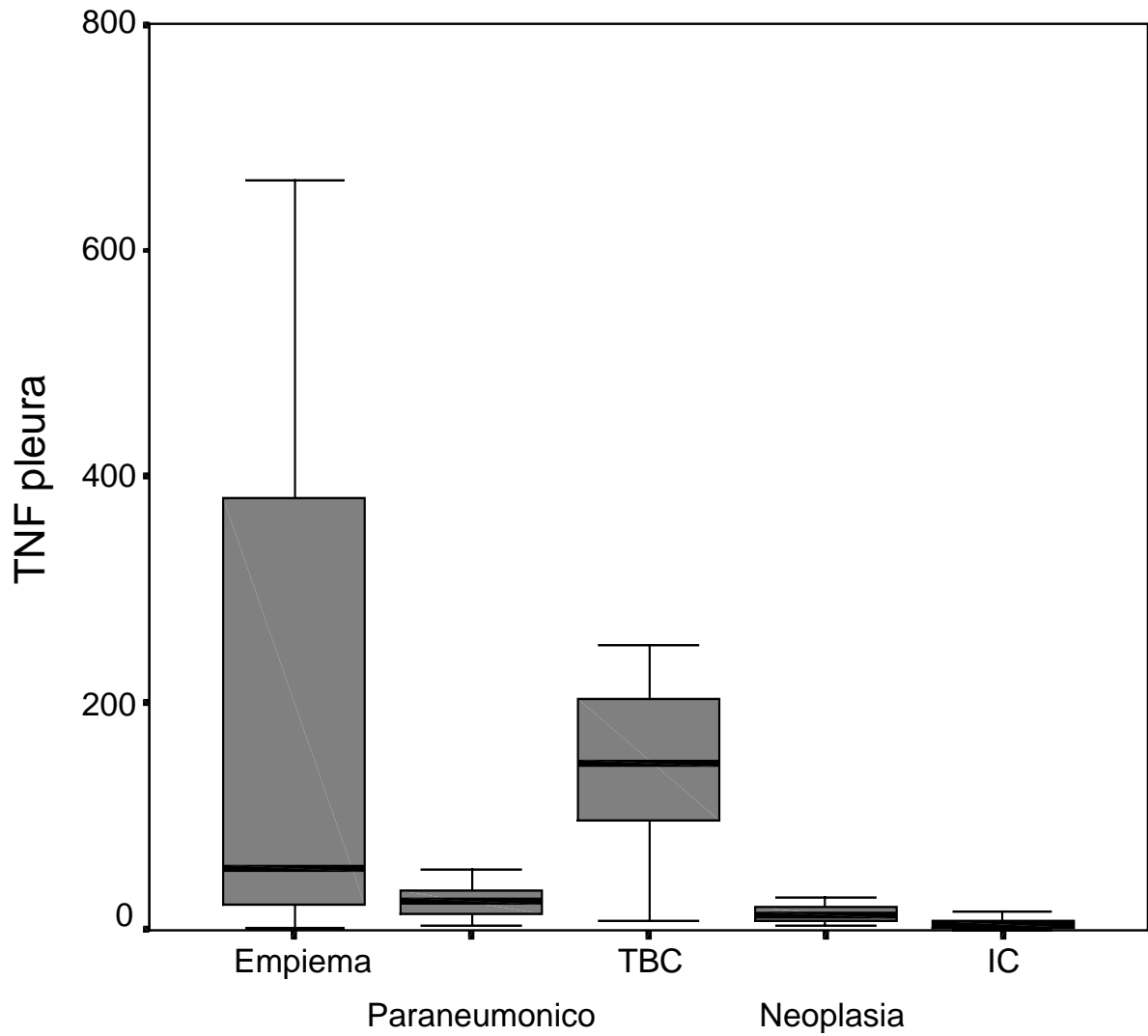


FIGURA 3. TNF- α EN LÍQUIDO PLEURAL



- **SISTEMA DE LA FIBRINOLISIS EN PLEURA (Tabla 10, figuras 4,5,6,7)**

Tanto los activadores de la fibrinolis, u-PA y t-PA, como sus inhibidores, PAI-1 Ag y PAI-2 Ag mostraron una mediana superior en los exudados (1,33 ng/ml, 15,20 ng/ml, 638,82 ng/ml, 47,55ng/ml respectivamente) que en los trasudados ($p < 0.001$, $p= 0.014$, $p= 0.001$, $p= 0.001$ respectivamente).

Los derrames pleurales tipo empiema y paraneumónicos complicados mostraron los niveles superiores de PAIs y de u-PA e inferiores de t-PA ($p= 0.001$).

TABLA 10. SISTEMA DE LA FIBRINOLISIS EN LÍQUIDO PLEURAL

		EMPIEMA	PARANEUMÓNICO NO COMPLICADO	TUBERCULOSO	NEOPLÁSICO	TRASUDADO
u – PA ng/ml	Med	1,99	0,83	1,34	1,88	0,34
	Per 25-75	1,32-5,68	0,55-1,32	1,06-2,27	0,92-7,52	0,21-0,51
	Rango	0,08-11,16	0,00-2,25	0,51-3,87	0,52-28,80	0,13-1,15
t – PA ng/ml	Med	5,73	23,10	15,21	22,00	9,39
	Per 25-75	2,15-22,90	12,04-38,45	8,08-23,60	14,50-35,85	6,82-13,00
	Rango	0,60-34,74	2,76-73,07	4,47-35,20	6,37-49,24	2,88-25,00
PAI – 1 ng/ml	Med	1203,20	104,79	1229,70	232,50	14,90
	Per 25-75	441,17-2267,20	17,24-1234,60	973,24-1725,4	78,88-747,48	11,50-31,60
	Rango	35,99-2585,60	0,50-1762,10	24,26-2166,7	35,78-1355,64	5,34-141,00
PAI – 2 ng/ml	Med	75,04	27,18	57,89	27,20	7,78
	Per 25-75	50,17-147,14	8,09-95,06	24,88-104,29	18,10-53,98	3,98-18,32
	Rango	1,79-297,42	0,00-267,22	0,00-214,19	1,40-53,98	0,76-27,33

FIGURA 4. u-PA EN LÍQUIDO PLEURAL

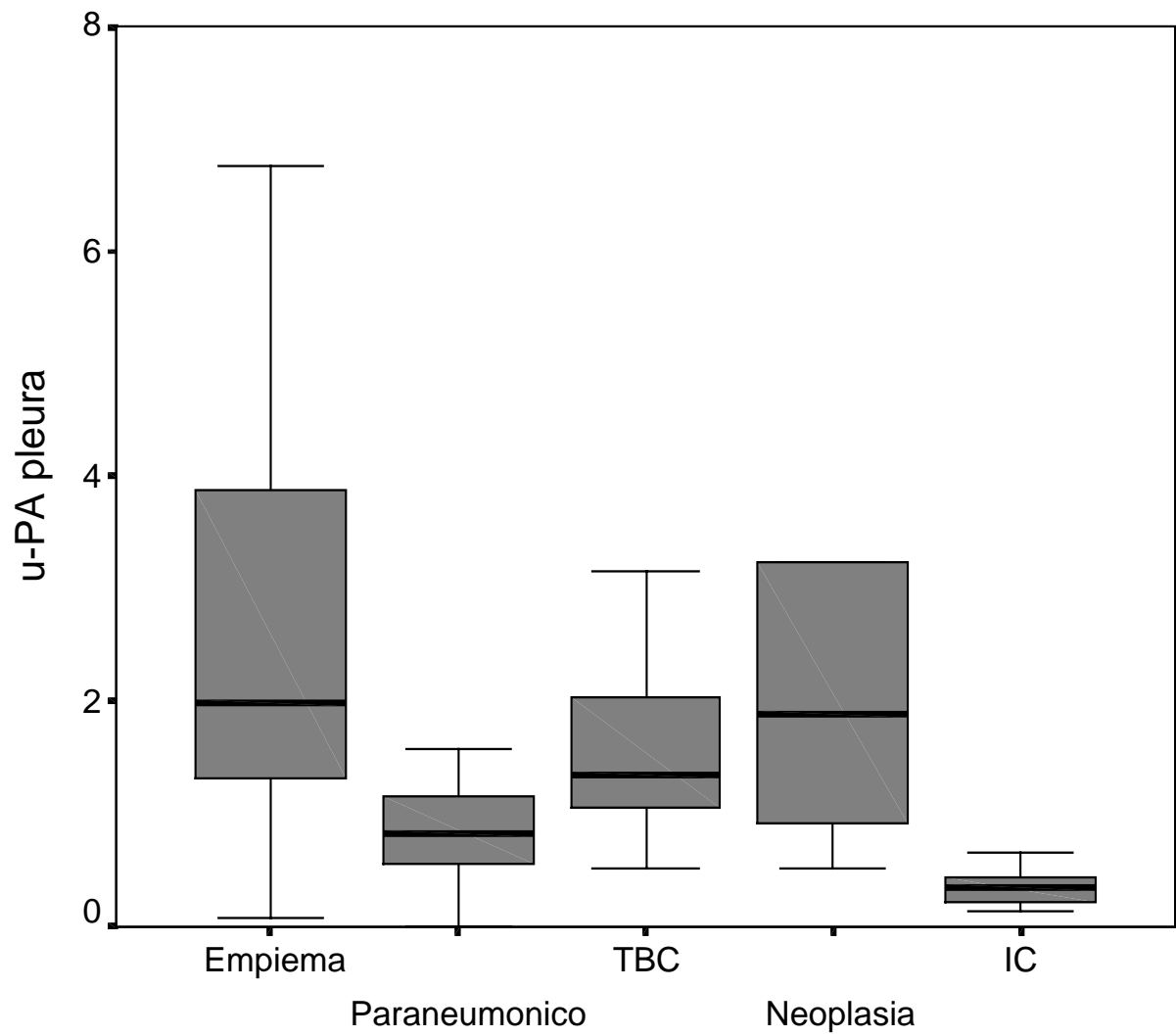


FIGURA 5. t-PA EN LÍQUIDO PLEURAL

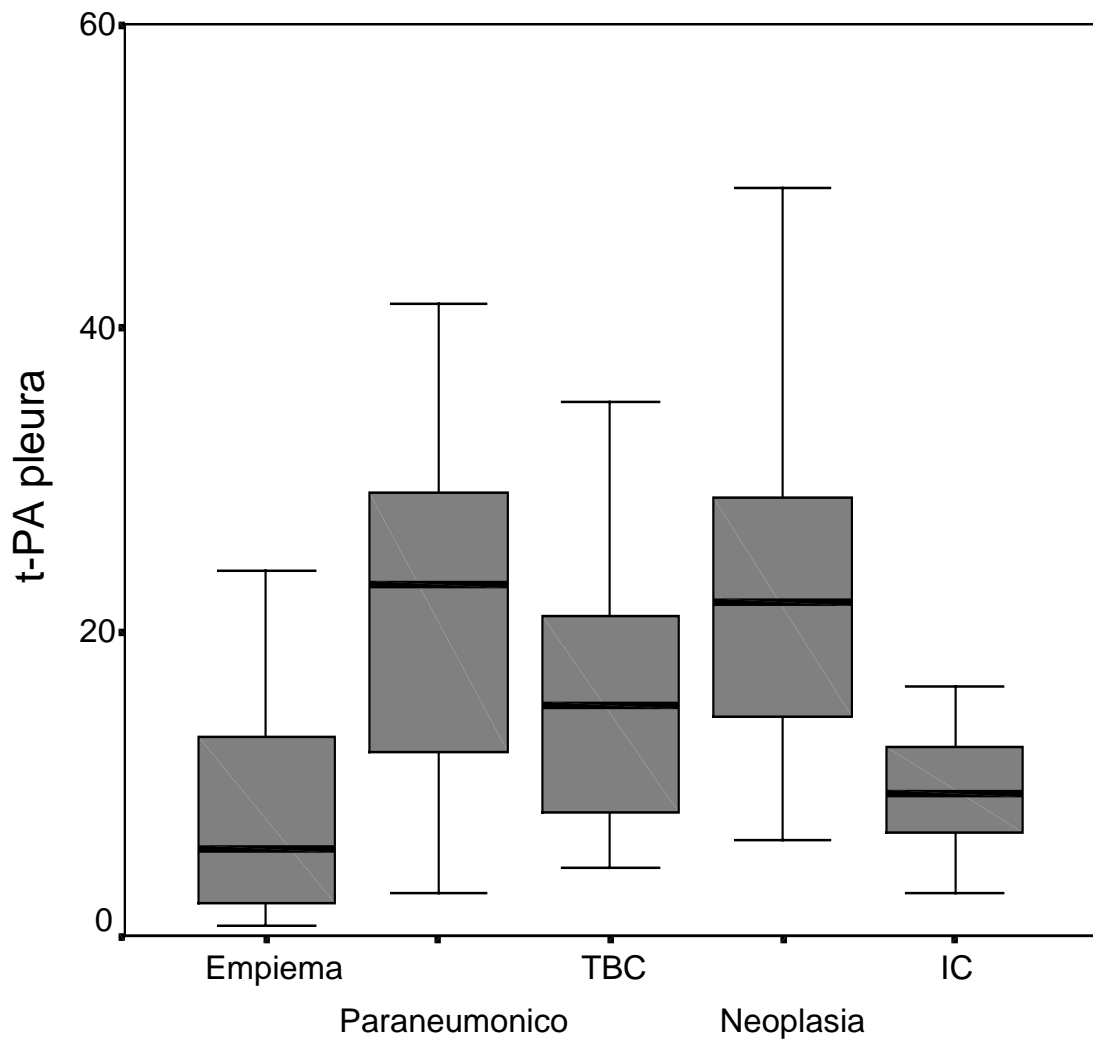


FIGURA 6. PAI 1 Ag EN LÍQUIDO PLEURAL

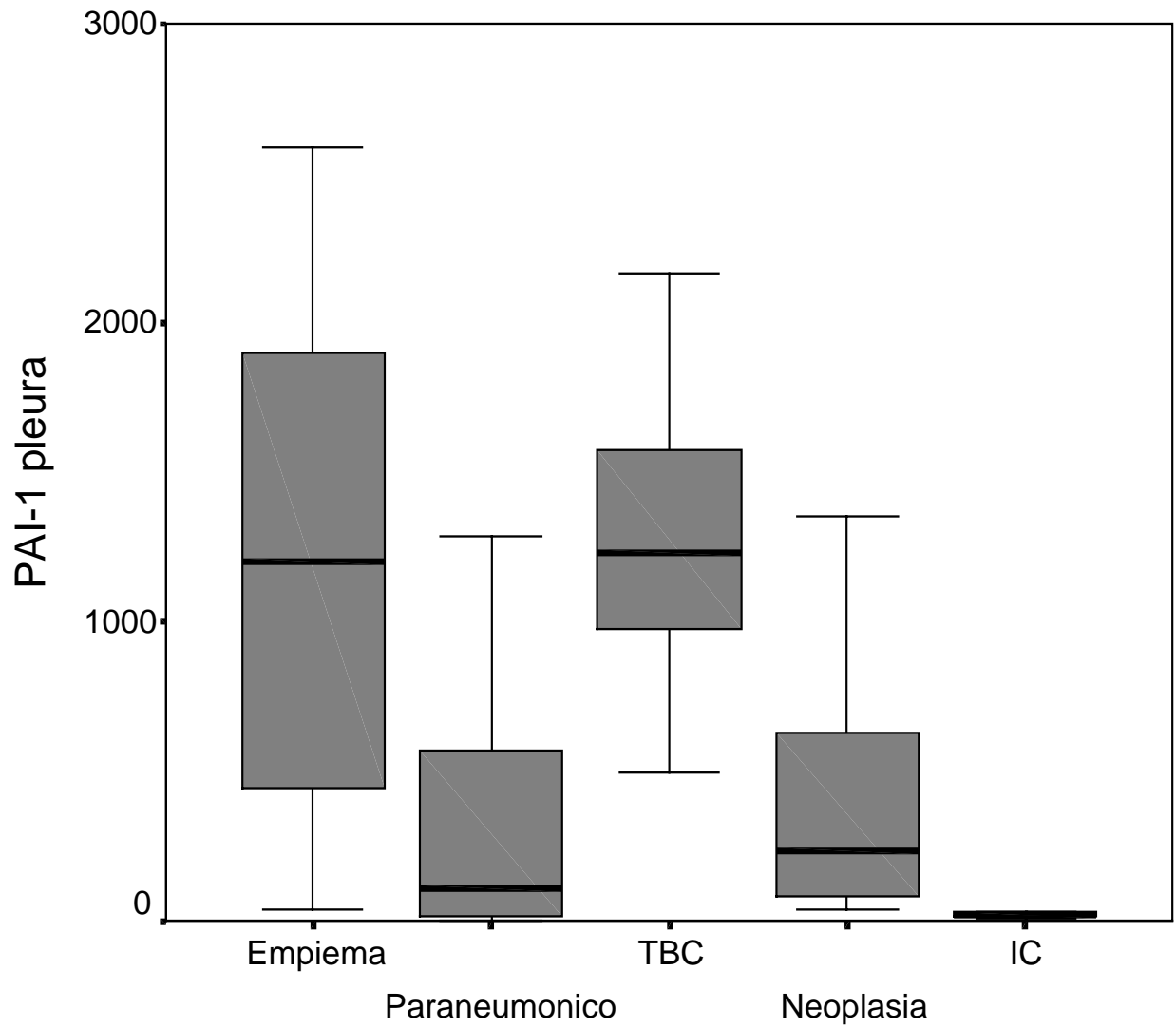
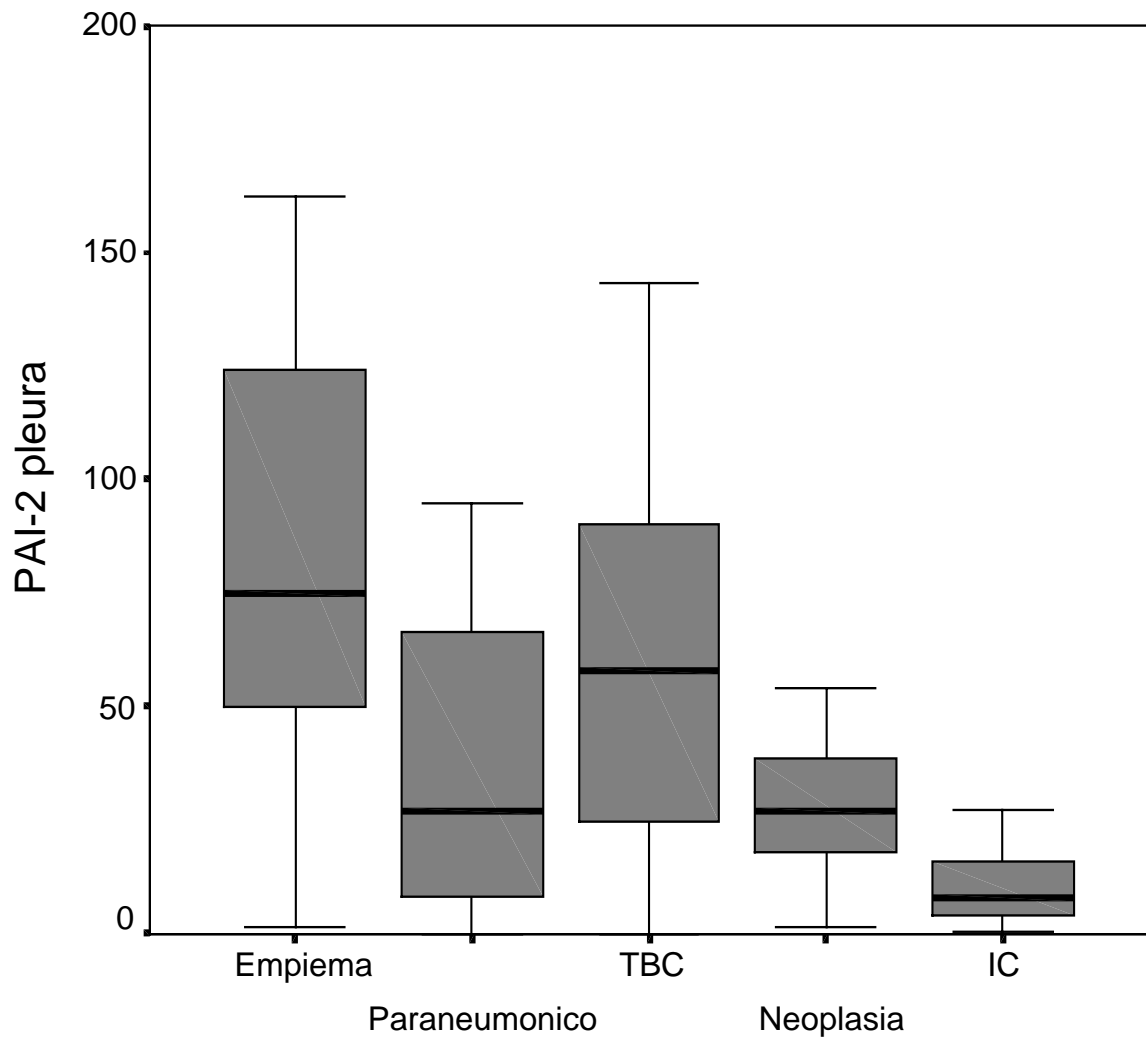


FIGURA 7. PAI 2 Ag EN LÍQUIDO PLEURAL



- **SISTEMA DE LAS METALOPROTEINASAS EN PLEURA (Tabla 11, figuras 8,9,10,11)**

La MMP-2, MMP-9 y TIMP-1 mostraron una mediana superior en exudados (1725,25 ng/ml, 58,12 ng/ml y 24850 ng/ml respectivamente) que en trasudados ($p < 0.001$).

Los niveles de MMP-2 fueron superiores en los derrames pleurales paraneumónicos no complicados que en los empiemas y paraneumónicos complicados ($p < 0.001$).

Los empiemas y derrames paraneumónicos complicados mostraron las cifras más elevadas de MMP-9 ($p = 0.015$).

TABLA 11. SISTEMA DE LAS METALOPROTEINASAS EN PLEURA

		EMPIEMA	PARANEUMÓNICO NO COMPLICADO	TUBERCULOSO	NEOPLÁSICO	TRASUDADO
MMP – 2 ng/ml	Med	1120,40	1847,90	1923,10	1796,50	1252,30
	Per 25-75	48,42-1465,70	1640,10-2491,30	1712,40-2920,30	1405,8-2359,60	1031,1-1543,20
	Rango	0,37-1898,00	1185,40-2632,70	1572,20-3489,30	1156,90-2740,9	754,43-1858,90
MMP – 9 ng/ml	Med	292,90	150,50	47,33	8,86	3,44
	Per 25-75	197,45-401,92	30,72-271,82	38,83-151,37	5,45-57,72	1,92-10,73
	Rango	3,53-780,80	1,39-426,27	6,07-257,40	1,42-217,89	0,78-40,65
TIMP – 1 ng/ml	Med	25900,00	26100,00	31800,00	15100,00	12100,00
	Per 25-75	13700-32600	17800,0-29300,00	24100,00-35800,0	13050,0-25900,	11600,0-14700
	Rango	1,25-36600	8564,70-37600,00	11700,0-38100,00	11300,0-36500,	8791,2-22800,0
TIMP – 2 ng/ml	Med	75,39	52,82	73,19	114,93	52,52
	Per 25-75	38,61-171,76	40,91-80,38	44,72-111,87	81,41-158,86	47,60-114,86
	Rango	26,62-864,02	32,03-133,40	26,40-181,90	46,34-643,20	19,71-142,69

FIGURA 8. MMP-2 EN LÍQUIDO PLEURAL

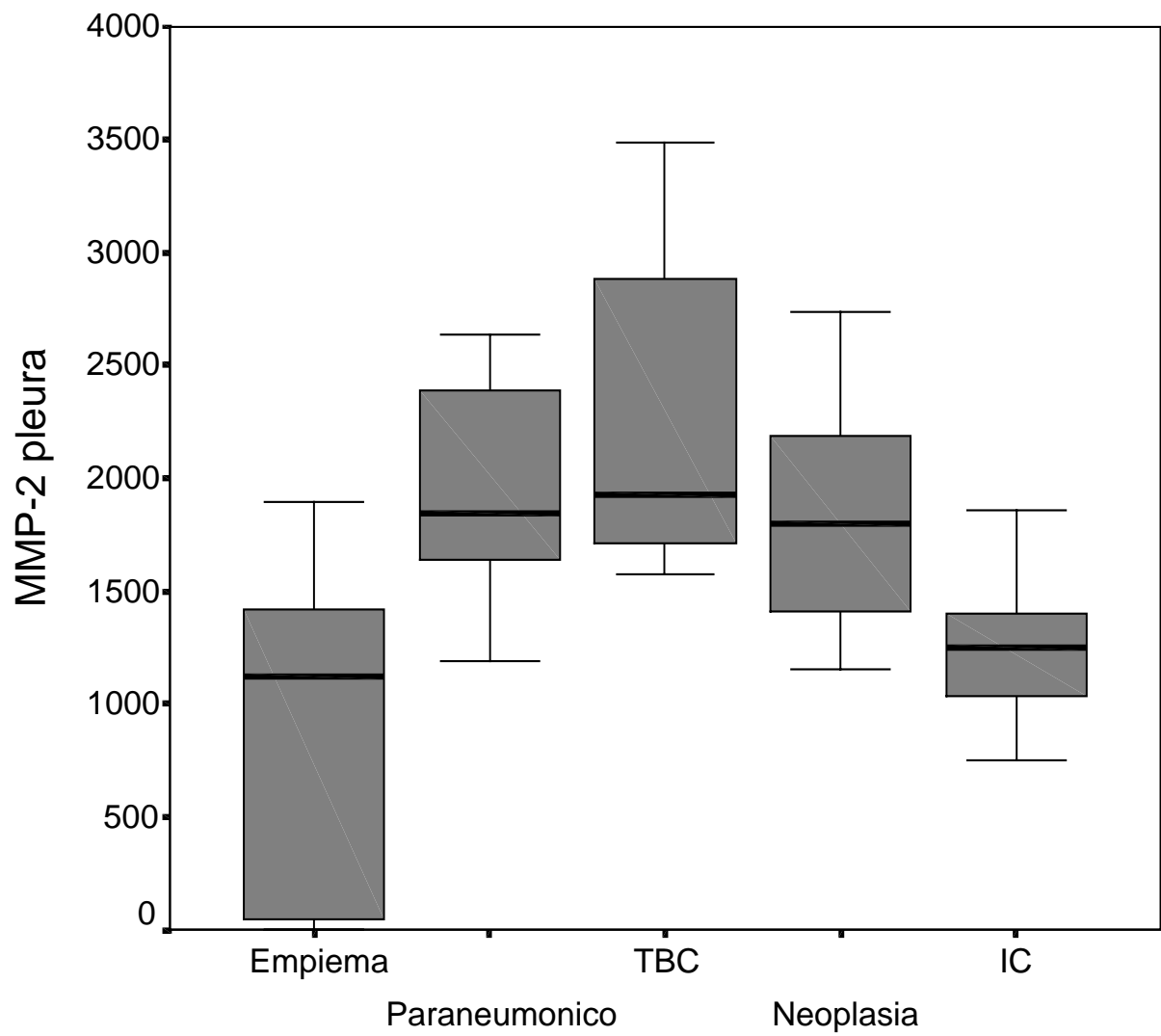


FIGURA 9. MMP-9 EN LÍQUIDO PLEURAL

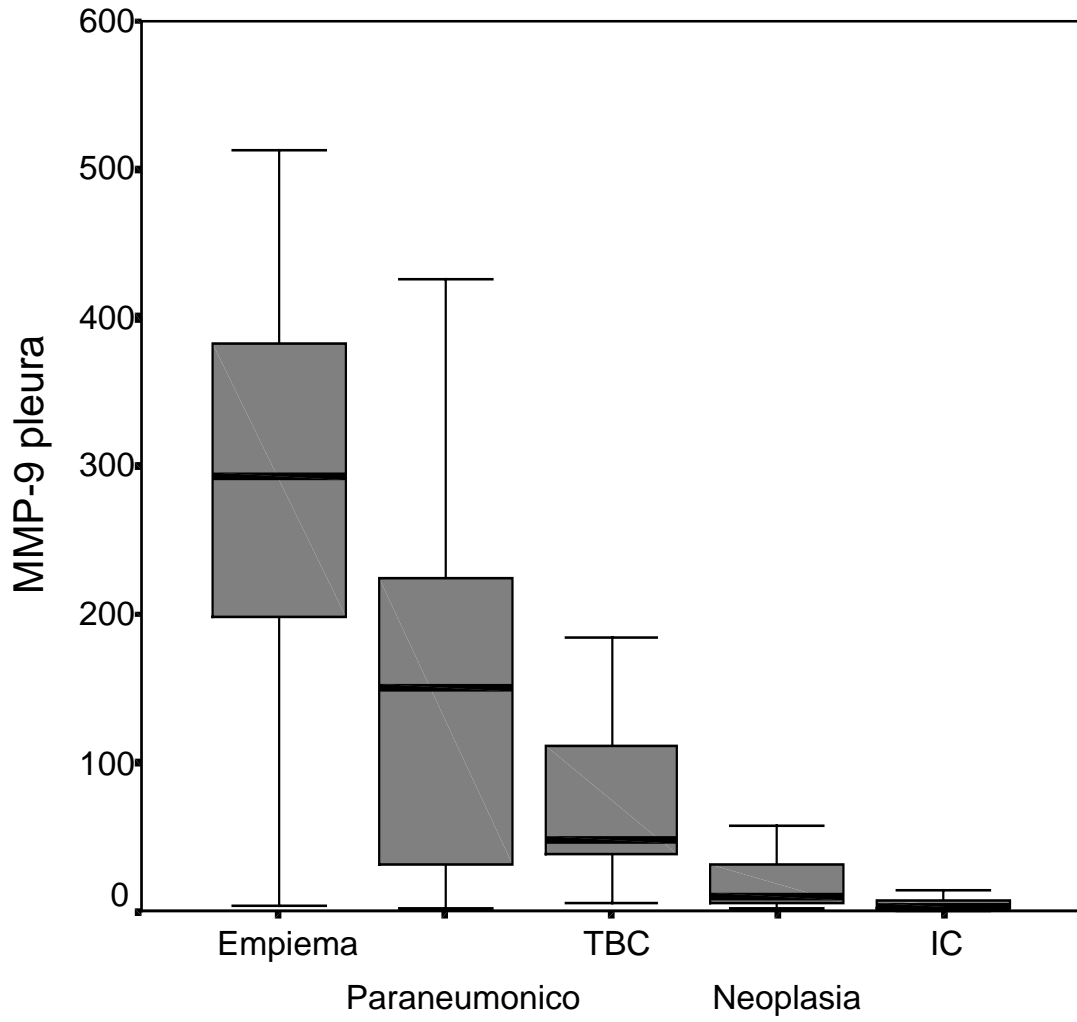


FIGURA 10. TIMP-1 EN LÍQUIDO PLEURAL

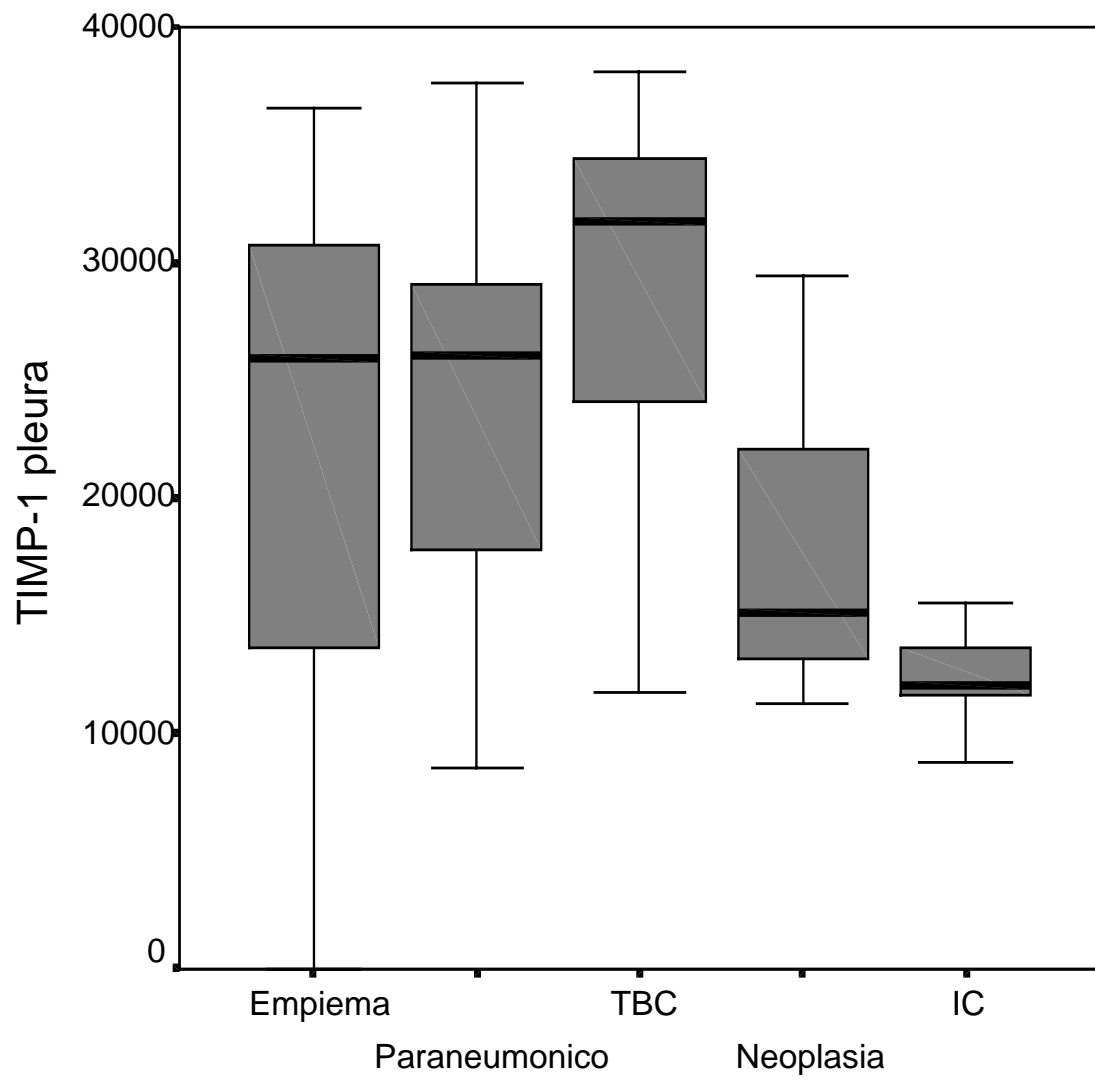
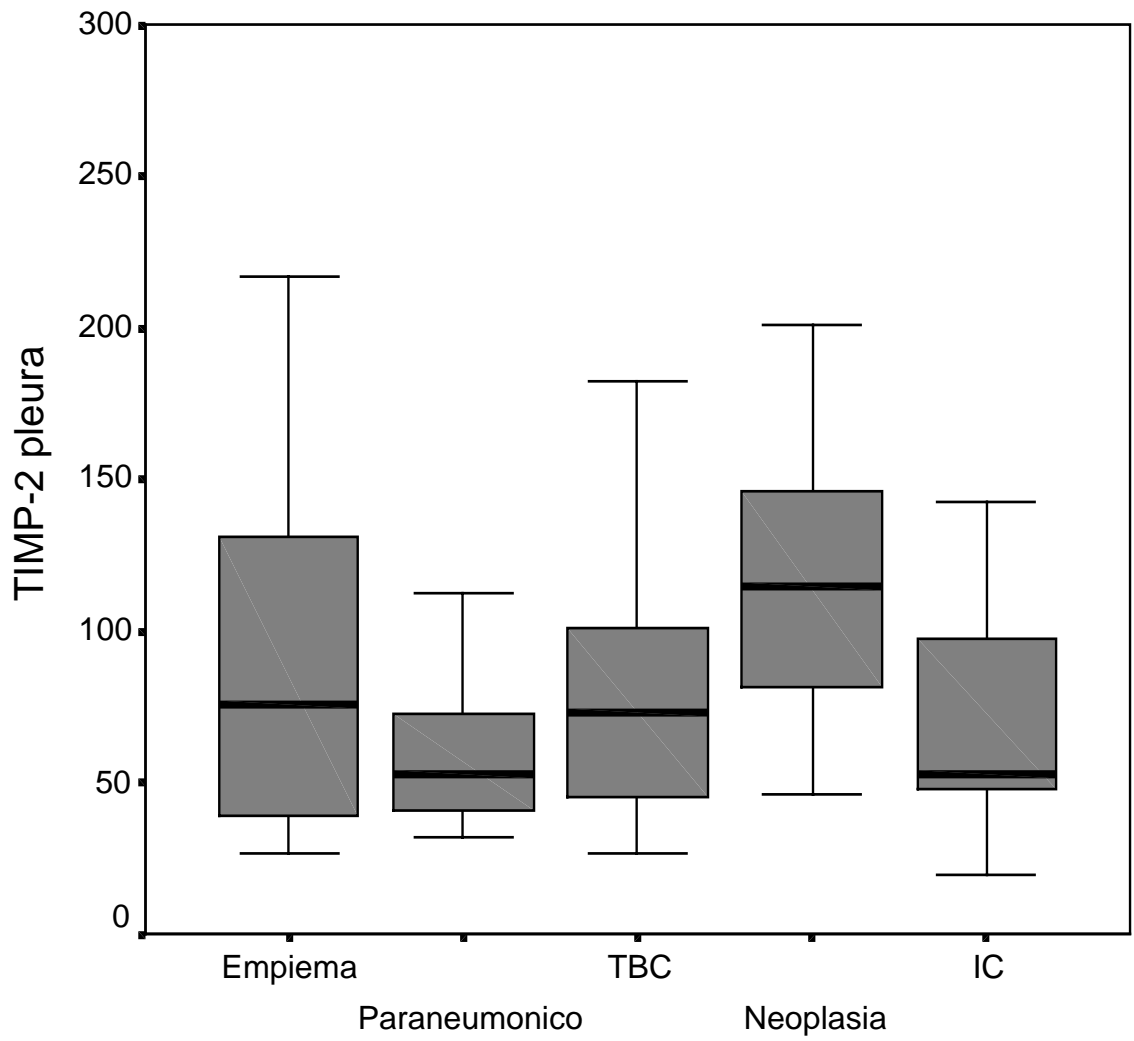


FIGURA 11. TIMP-2 EN LÍQUIDO PLEURAL



- **SISTEMA DE LA ANGIOGÉNESIS EN PLEURA (Tablas 12.1 - 12.7, figuras 12,13,14,15,16)**

En la tabla 12.1 se muestra como los derrames pleurales exudados presentaron niveles más elevados de los factores activadores de la angiogénesis b-FGF y VEGF total y libre y del inhibidor TSP-1 que los trasudados ($p < 0.001$).

En la tabla 12.2 se observa como los derrames pleurales infecciosos (empiemas + paraneumónicos complicados + paraneumónicos no complicados + tuberculosos) presentaron niveles más elevados del activador b-FGF que los derrames neoplásicos ($p = 0.007$). La mediana del factor VEGF fue superior en los derrames pleurales neoplásicos que en los infecciosos en su conjunto, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En la tabla 12.3 se muestran los valores de las medianas, los percentiles 25-75 y el rango mínimo-máximo de los factores activadores e inhibidores de la angiogénesis según la etiología del derrame pleural. En las tablas 12.4 y 12.5 se expresa el grado de significación de la comparación de medias de los factores activadores e inhibidores de la angiogénesis en líquido pleural, en los diferentes grupos de estudio.

Los niveles pleurales de los factores angiogénicos b-FGF, VEGF total y VEGF libre y de la TSP-1 fueron superiores en el grupo de los empiemas y paraneumónicos complicados que en el resto de categorías de derrame pleural.

En el grupo de los derrames pleurales paraneumónicos, los empiemas y paraneumónicos complicados presentaron una mediana superior de los factores activadores b-FGF, VEGF total, VEGF libre y del inhibidor TSP-1 ($p < 0.001$) que los paraneumónicos no complicados. La endostatina, por el contrario, mostró niveles más elevados en los derrames paraneumónicos no complicados ($p = 0.002$).

La incidencia de complicaciones tardías en forma de paquipleuritis en los derrames pleurales infecciosos fue del 38,1% (16/42) para los el grupo de paraneumónicos y empiemas y del 28,6% (6/21) para los tuberculosos (tabla 12.6). Los derrames paraneumónicos con cifras más altas de los factores b-FGF, VEGF y TSP-1 presentaron mayor incidencia de paquipleuritis (tabla 12.7). La presencia de paquipleuritis en los derrames tuberculosos no mostró ningún tipo de asociación con los factores implicados en la angiogénesis.

TABLA 12.1. ANGIOGÉNESIS EN EXUDADOS Y TRASUDADOS

		EXUDADOS	TRASUDADOS	P
b-FGF (pg/ml)	Med Per 25-75 Rango	3,00 3,00 - 10,63 3,00 - 511,82	3,00 3,00 - 3,00 3,00 - 4,00	< 0.001
VEGF total (pg/ml)	Med Per 25-75 Rango	1213,40 332,70-4028,07 9,00-35600,00	97,41 72,90-133,21 29,38-393,57	< 0.001
VEGF libre (pg/ml)	Med Per 25-75 Rango	686,60 133,30-3613,25 18,60-26200,00	28,82 18,67 - 54,36 18,60 - 189,70	< 0.001
TSP-1 (ng/ml)	Med Per 25-75 Rango	4165,48 2781,07-5977,9 249,52-23300,0	1088,00 835,47-1379,15 3,91-2086,70	< 0.001
Endostatina (ng/ml)	Med Per 25-75 Rango	27,60 19,21-37,10 1,95-111,58	26,10 22,51-38,54 5,49-57,19	ns

ns: no significativo

TABLA 12.2. ANGIOGÉNESIS EN LOS DERRAMES PLEURALES INFECCIOSOS Y NEOPLÁSICOS

		DERRAMES INFECCIOSOS	DERRAMES NEOPLÁSICOS	P
b-FGF (pg/ml)	Med Per 25-75 Rango	3,53 3,00-15,32 3,00-511,82	3,00 3,00-4,06 3,00-9,33	0.007
VEGFtotal (pg/ml)	Med Per 25-75 Rango	1096,60 302,73-4082,50 9,00-26100,00	2166,10 377,26-3990,90 52,32-35600,00	ns
VEGF libre (pg/ml)	Med Per 25-75 Rango	618,72 131,92-3287,00 18,60-24400,00	809,02 134,50-5431,30 50,77-26200,00	ns
TSP-1 (ng/ml)	Med Per 25-75 Rango	4295,40 3029,90-7025,9 249,52-15300,0	3998,70 2760,8-4949,25 1530,0-23300,0	ns
Endostatina (ng/ml)	Med Per 25-75 Rango	27,20 19,05-36,31 1,95-111,58	30,22 20,60-37,62 12,03-45,50	ns

ns: no significativo

TABLA 12.3. ANGIOGÉNESIS EN LOS GRUPOS ETIOLÓGICOS DE DERRAME PLEURAL

		EMPIEMA	PARANEUMÓNICO NO COMPLICADO	TUBERCULOSO	NEOPLÁSICO	TRASUDADO
b – FGF pg/ml	Med	35,20	3,00	3,00	3,00	3,00
	Per 25-75	12,32-133,3	3,00-10,26	3,00-4,83	3,00-7,37	3,00-3,00
	Rango	3,00-511	3,00-28	3,00-21	3,00-9	3,00-4
VEGFtotal pg/ml	Med	6858,70	470,47	959,28	2166,10	97,41
	Per 25-75	2295,4-14500,0	267,11-2419,50	547,88-1941,50	395,27-5048,10	77,12-140,87
	Rango	9,00-26100	18,09-5101	9,00-3692	52,32-35600	29,38-393
VEGF libre pg/ml	Med	5147,00	326,46	503,90	809,02	28,82
	Per 25-75	597,47-16500,00	74,50-1726,00	75,83-1664,2	136,90-8335,00	18,74-67,40
	Rango	18,60-24400	18,60-4933	18,60-4009	50,77-26200	18,60-189
TSP – 1 ng/ml	Med	7426,70	3584,20	3293,10	3998,70	1088,00
	Per 25-75	6016,90-10700,00	2140,90-4994,0	2275,70-4488,80	2774,30-5474,7	838,98-1471,60
	Rango	4295,40-12100	249,52-15300	1537,90-7077	1530,00-23300	3,91-2086
Endostatina ng/ml	Med	19,20	34,30	26,40	30,22	26,10
	Per 25-75	11,55-37,37	31,24-43,35	19,66-86,14	20,62-38,16	23,06-41,35
	Rango	1,95-58	11,20-89	6,13-111	12,03-38,16	5,49-57

FIGURA 12. b-FGF EN LÍQUIDO PLEURAL

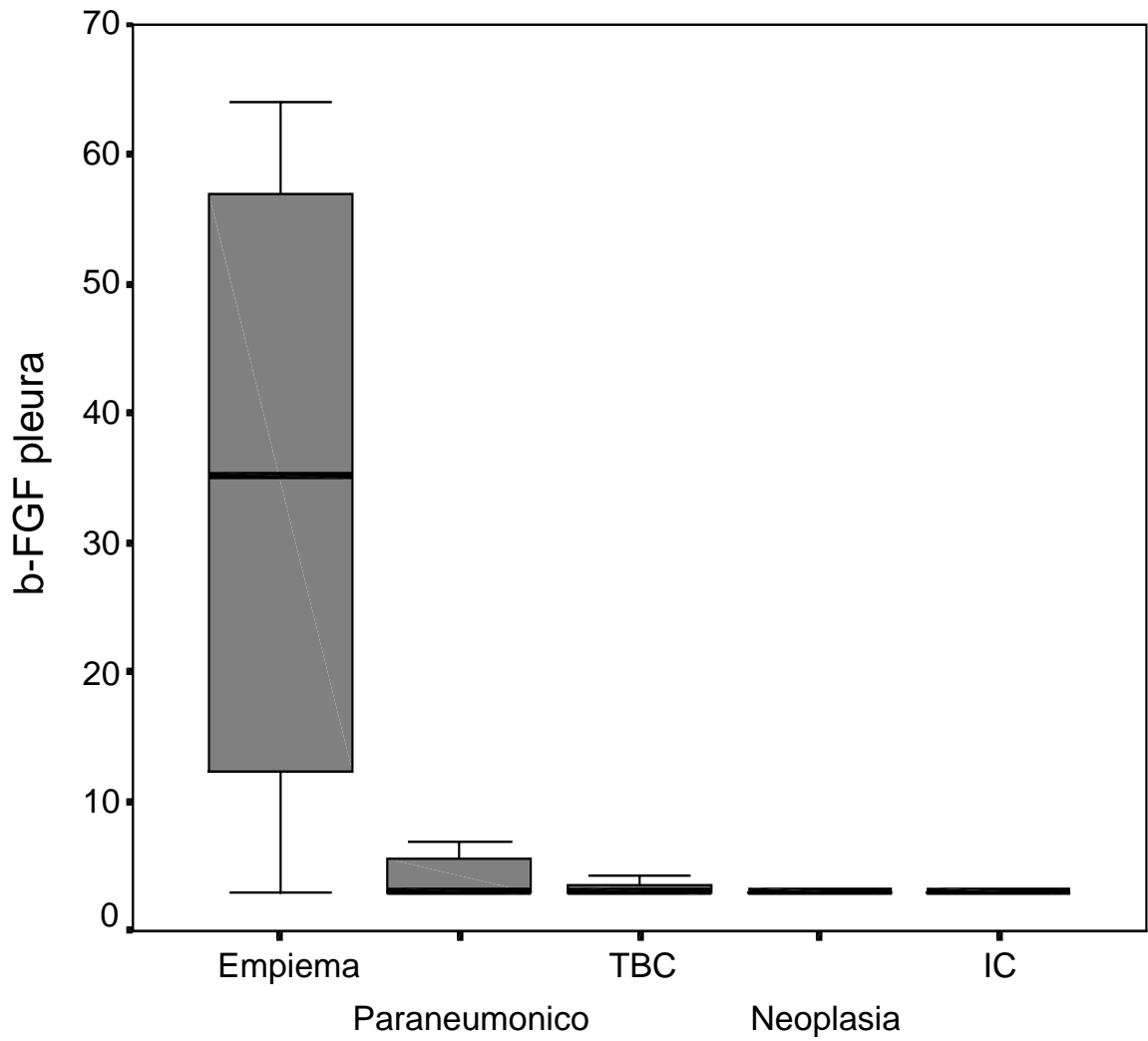


FIGURA 13. VEGF total EN LÍQUIDO PLEURAL

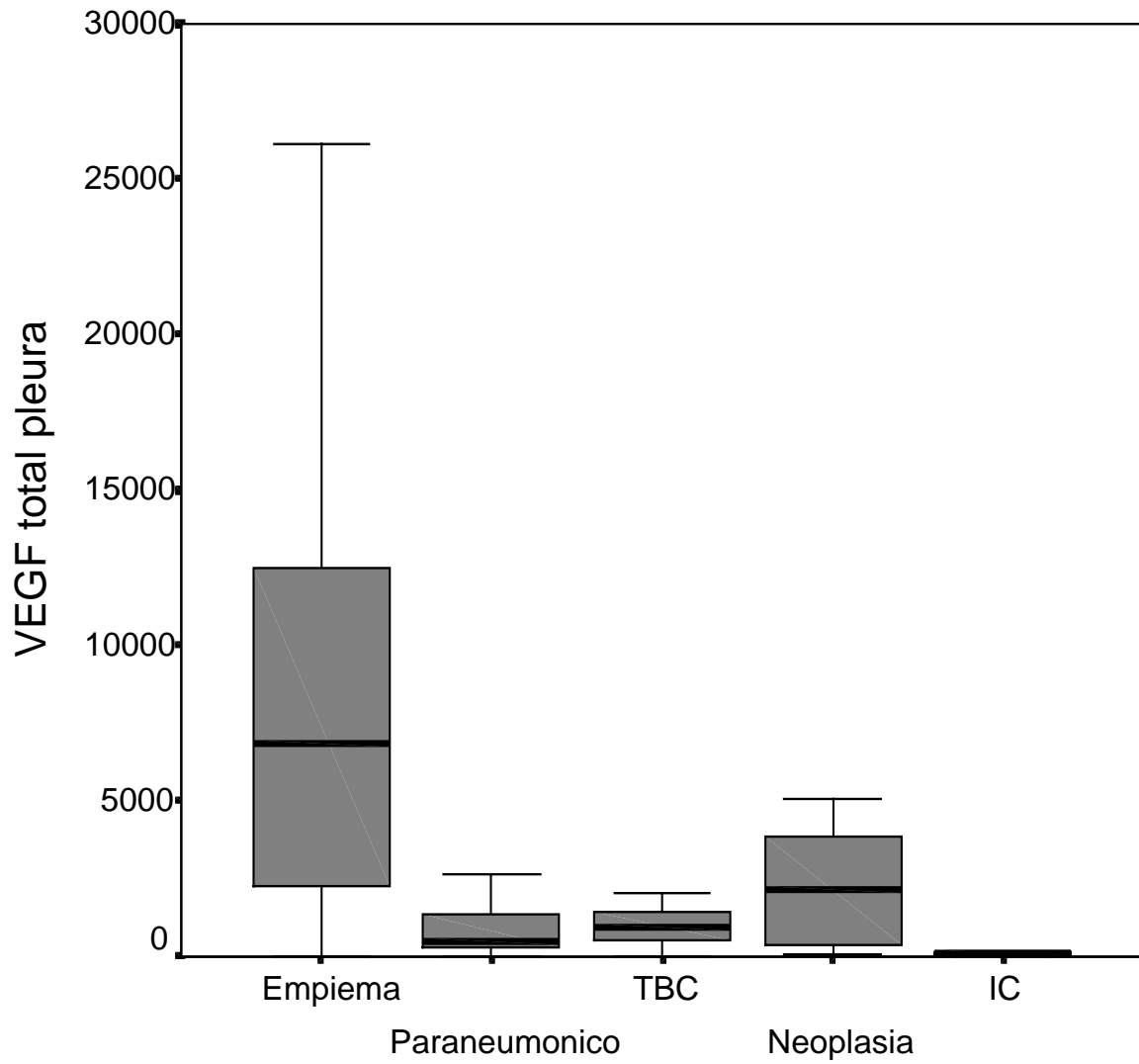


FIGURA 14. VEGF libre EN LÍQUIDO PLEURAL

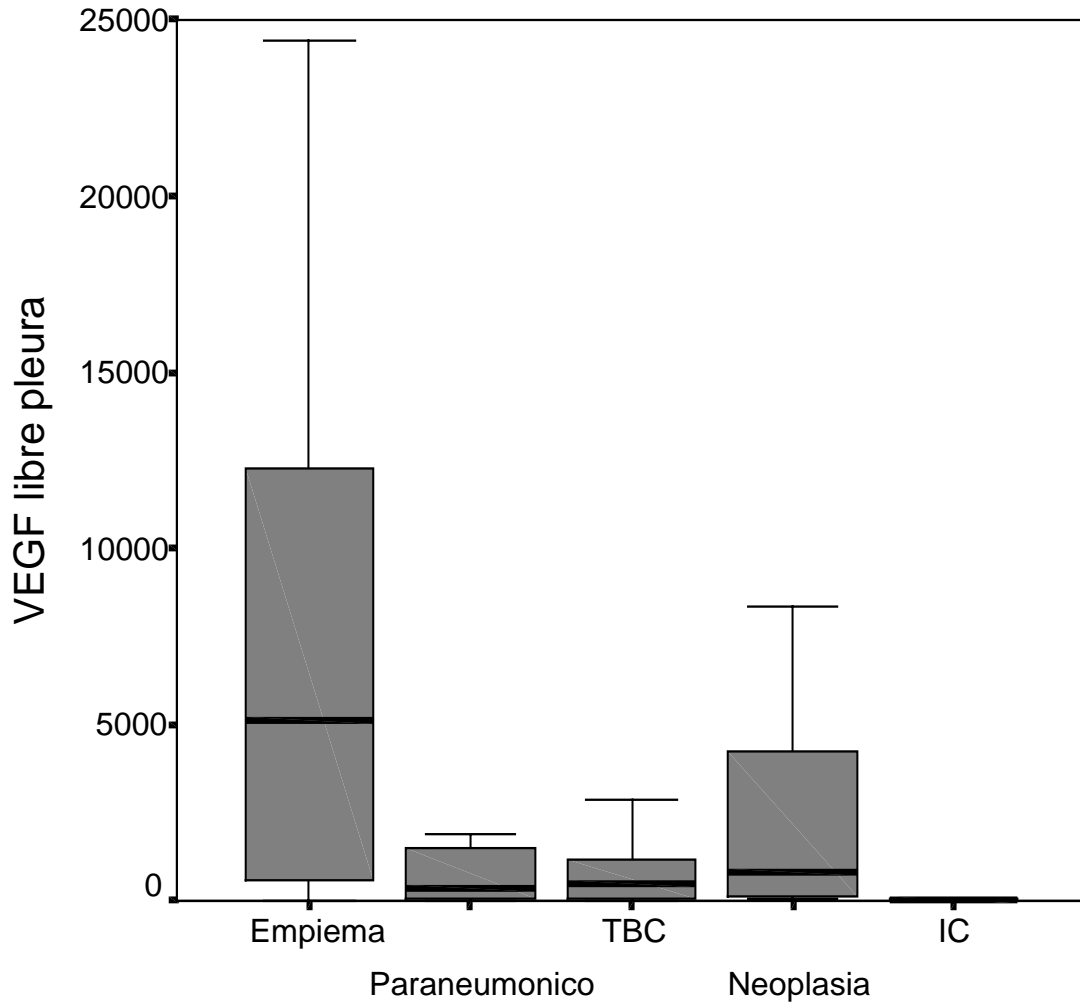


FIGURA 15. TSP-1 EN LÍQUIDO PLEURAL

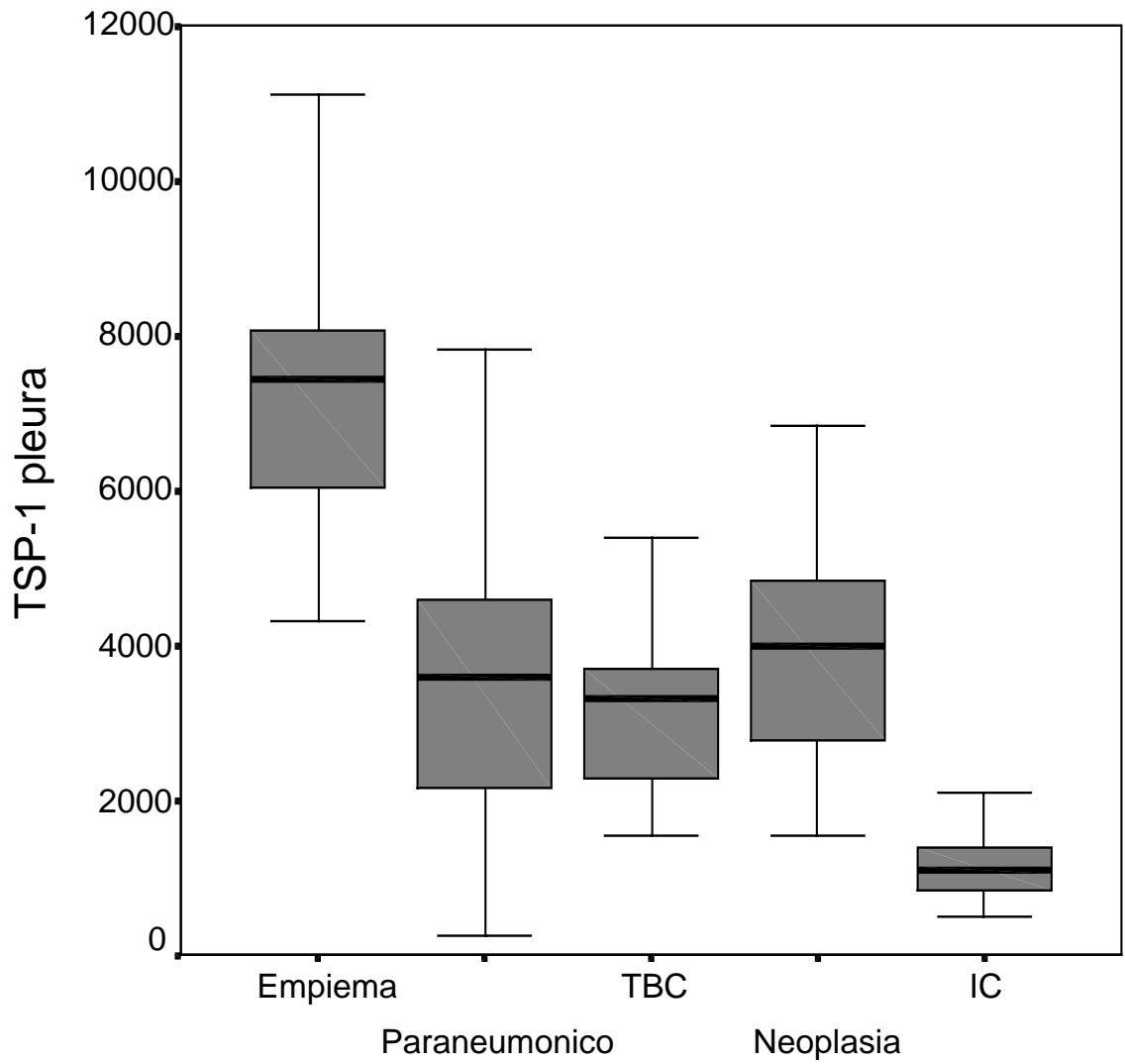


FIGURA 16. ENDOSTATINA EN LÍQUIDO PLEURAL

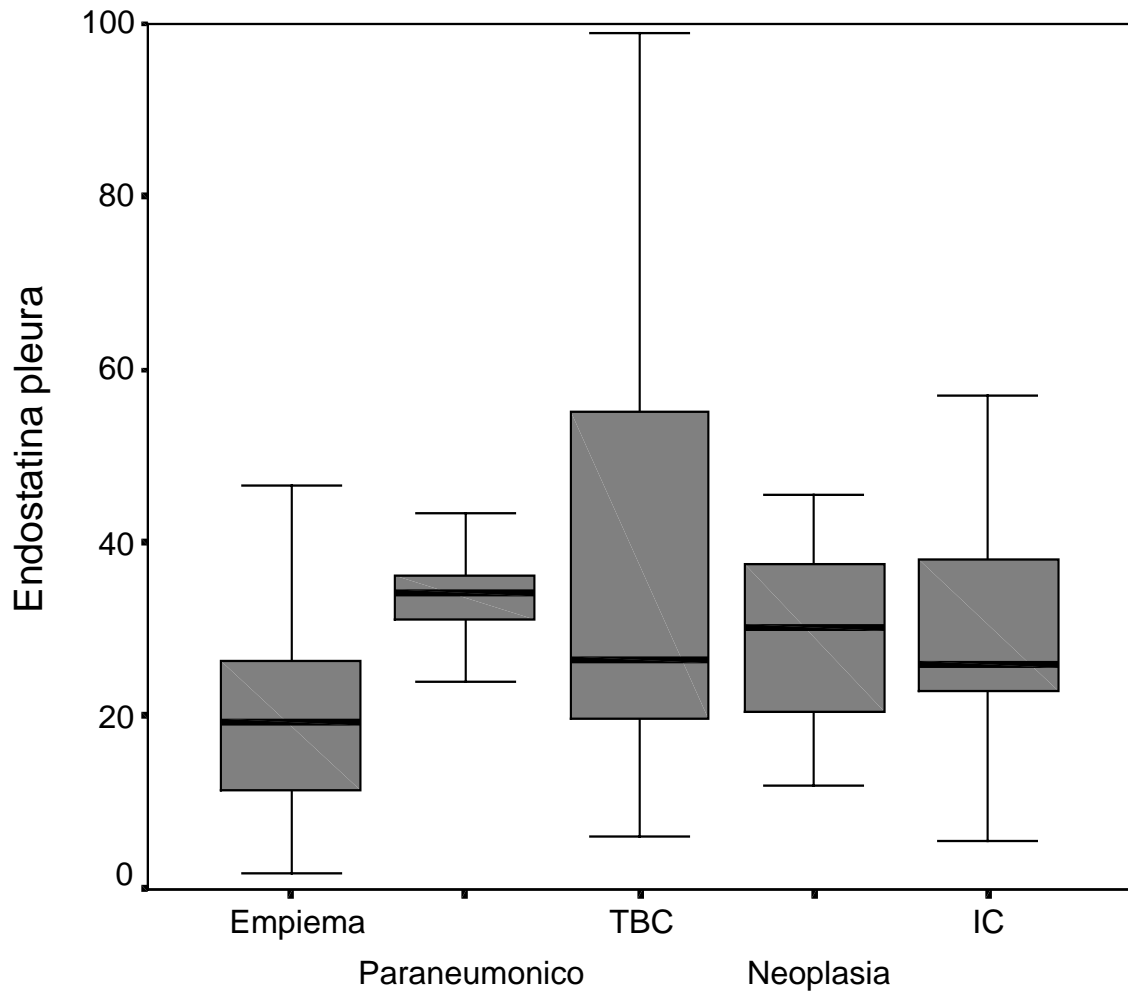


TABLA 12.4. GRADO DE SIGNIFICACIÓN DE LA COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS FACTORES ACTIVADORES DE LA ANGIOGÉNESIS EN PLEURA

	Comparación entre grupos	Significación (p)
	Exudados vs trasudados	<0.001
	Infeciosos vs neoplásicos	0.007
	Paraneumónicos vs neoplásicos	0.001
	Empiema y PNC vs neoplásicos	<0.001
b-FGF	PNNC vs neoplásicos	ns
(pg/ml)	Tuberculosos vs neoplásicos	ns
	Paraneumónicos vs tuberculosos	0.003
	Empiema y PNC vs tuberculosos	<0.001
	PNNC vs tuberculosos	ns
	Empiema y PNC vs PNNC	<0.001
	Exudados vs trasudados	<0.001
	Infeciosos vs neoplásicos	ns
	Paraneumónicos vs neoplásicos	ns
	Empiema y PNC vs neoplásicos	0.038
VEGF total	PNNC vs neoplásicos	0.04
(pg/ml)	Tuberculosos vs neoplásicos	ns
	Paraneumónicos vs tuberculosos	ns
	Empiema y PNC vs tuberculosos	<0.001
	PNNC vs tuberculosos	ns
	Empiema y PNC vs PNNC	<0.001

	Exudados vs trasudados	<0.001
	Infecciosos vs neoplásicos	ns
	Paraneumónicos vs neoplásicos	ns
	Empiema y PNC vs neoplásicos	ns
VEGF libre	PNNC vs neoplásicos	ns
(pg/ml)	Tuberculosos vs neoplásicos	ns
	Paraneumónicos vs tuberculosos	ns
	Empiema y PNC vs tuberculoso	0.002
	PNNC vs tuberculosos	ns
	Empiema y PNC vs PNNC	<0.001

ns = no significativo ; Paraneumónicos : empiemas + paraneumónicos complicados + paraneumónicos no complicados ; PNC : paraneumónico complicado ; PNNC : paraneumónico no complicado

TABLA 12.5. GRADO DE SIGNIFICACIÓN DE LA COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS FACTORES INHIBIDORES DE LA ANGIOGÉNESIS EN PLEURA

	Comparación entre grupos	Significación (p)
	Exudados vs trasudados	<0.001
	Infecciosos vs neoplásicos	ns
	Paraneumónicos vs neoplásicos	ns
	Empiema y PNC vs neoplásicos	<0.001
TSP-1	PNNC vs neoplásicos	ns
(ng/ml)	Tuberculosos vs neoplásicos	ns
	Paraneumónicos vs tuberculosos	0.001
	Empiema y PNC vs tuberculoso	<0.001
	PNNC vs tuberculosos	ns
	Empiema y PNC vs PNNC	<0.001
	Exudados vs trasudados	ns
	Infecciosos vs neoplásicos	ns
	Paraneumónicos vs neoplásicos	ns
	Empiema y PNC vs neoplásicos	ns
Endostatina	PNNC vs neoplásicos	ns
(ng/ml)	Tuberculosos vs neoplásicos	ns
	Paraneumónicos vs tuberculosos	ns
	Empiema y PNC vs tuberculoso	0.043
	PNNC vs tuberculosos	ns
	Empiema y PNC vs PNNC	0.002

TABLA 12.6. PRESENCIA DE PAQUIPLEURITIS EN LOS DERRAMES PLEURALES INFECCIOSOS

TIPO DE DERRAME PLEURAL	PAQUIPLEURITIS
Empiemas y paraneumónicos complicados	12 (57,1%)
Paraneumónicos no complicados	4 (19,0%)
Tuberculosos	6 (28,6%)

TABLA 12.7. ASOCIACIÓN ENTRE EL SISTEMA DE LA ANGIOGÉNESIS Y LA PRESENCIA DE PAQUIPLEURITIS EN LOS DERRAMES PLEURALES BACTERIANOS PARANEUMÓNICOS

	SIGNIFICACIÓN (P)
b-FGF	0.048
VEGF total	0.017
VEGF libre	0.041
TSP-1	0.029
Endostatina	ns

ns: no significativo

1.3. COMPARACIÓN DE MEDIAS ENTRE PLASMA Y PLEURA DE LOS FACTORES IMPLICADOS EN LA ANGIOGÉNESIS

El factor angiogénico VEGF tanto en su forma total como libre presenta diferencias significativas entre los niveles pleurales y plasmáticos en todos los grupos etiológicos (excepto en los trasudados para VEGF libre), con cifras superiores en el espacio pleural. El factor b-FGF, por el contrario, sólo muestra diferencias significativas en el grupo de los empiemas ; en el resto de grupos etiológicos el b-FGF no presenta diferencias entre el líquido pleural y el plasma.

La TSP-1 muestra valores superiores en plasma que en pleura con diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos de derrame pleural excepto en el de los empiemas y paraneumónicos complicados.

La endostatina muestra valores superiores en el líquido pleural que en el plasma en los exudados, pero la diferencia sólo es significativa en los derrames tuberculosos. En los trasudados, por el contrario, los niveles de endostatina son significativamente superiores en plasma que en pleura.

TABLA 13. PLASMA Y PLEURA SEGÚN EL DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

	Empiema	Paraneumónico	Tuberculoso	Neoplásico	Trasudado
pleura/plasma b-FGF	35,2/3,00 p < 0.001	3,00/3,00 p = 0,241	3,00/3,00 p = 0.314	3,00/3,00 p = 0.333	3,00/3,00 p = 0.017
pleura/plasma VEGF total	6858,7/155,16 p < 0.001	470,47/79,78 p < 0.001	959,28/71,49 p < 0.001	2166,10/70,01 p < 0.001	97,41/42,60 p = 0.046
pleura/plasma VEGF libre	5147,0/81,25 p < 0.001	326,46/18,60 p = 0.001	503,90/18,60 p < 0.001	809,02/18,60 p = 0.001	28,82/18,60 p = 0.408
pleura/plasma TSP-1	7426,7/8478,3 p = 0.289	3584,2/15800 p < 0.001	3293,1/11200 p < 0.001	3998,7/14300 p < 0.001	1088,0/7762,2 p < 0.001
pleura/plasma Endostatina	19,20/18,32 p = 0,876	34,30/31,67 p = 0.159	26,40/19,52 p = 0.016	30,22/22,98 p = 0.073	26,10/45,39 p = 0.002

- **CORRELACIÓN PLASMA Y LÍQUIDO PLEURAL SEGÚN EL DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO. (Tabla 14)**

No se ha detectado correlación entre los niveles pleurales y plasmáticos en los parámetros implicados en la angiogénesis (b-FGF, VEGF total y libre, TSP-1) en ninguno de los grupos etiológicos. Una excepción es el factor inhibidor endostatina, que mantiene correlación entre los niveles pleurales y plasmáticos en los derrames pleurales tipo empiema, paraneumónico complicado y paraneumónico no complicado ($p < 0.001$).

TABLA 14. CORRELACIÓN PLASMA Y LÍQUIDO PLEURAL SEGÚN EL DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

		Empiema	Paraneumónico	Tuberculoso	Neoplásico	Trasudado
pleura/plasma b-FGF	r	-0.089	0.039	0.107	0.070	0.228
	p	0.701	0.867	0.643	0.764	0.321
pleura/plasma VEGF total	r	0.025	-0.219	0.246	-0.079	0.049
	p	0.915	0.339	0.283	0.733	0.831
pleura/plasma VEGF libre	r	0.290	-0.008	0.453	-0.214	0.162
	p	0.202	0.972	0.039	0.352	0.482
pleura/plasma TSP-1	r	-0.155	0.022	0.307	0.418	0.217
	p	0.501	0.924	0.176	0.060	0.345
pleura/plasma Endostatina	r	0.621	0.695	0.284	0.356	0.404
	p	0.003	< 0.001	0.211	0.113	0.069

2. CORRELACIÓN

Para estudiar la existencia y el grado de asociación entre los factores implicados en la angiogénesis con los marcadores bioquímicos pH, LDH, ADA, proteínas, celularidad y recuento diferencial, marcadores inflamatorios (elastasa polimorfonuclear, IL-8, TNF-alfa), los del sistema de la fibrinólisis (u-PA, t-PA, PAI-1 y PAI-2) y el sistema de las metaloproteinasas (MMP-2, MMP-9, TIMP-1 y TIMP-2) en líquido pleural se ha realizado la correlación de Spearman.

La correlación de Spearman se establece de forma global en todos los grupos de exudado pleural, en los derrames pleurales infecciosos paraneumónicos (empiema, paraneumónico complicado y paraneumónico no complicado), en los derrames tuberculosos, en los derrames neoplásicos y finalmente en el grupo control de los trasudados secundarios a insuficiencia cardíaca.

2.1. DERRAMES PLEURALES EXUDADOS

2.1.1. CORRELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS HABITUALES Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGÉNESIS (Tabla 15)

Existe correlación entre los valores bajos de pH y de glucosa y los valores elevados de LDH y los factores activadores de la angiogénesis y el inhibidor TSP-1. La endostatina no se correlacionó con ninguno de los marcadores estudiados.

TABLA 15. CORRELACIÓN ENTRE Ph, GLUCOSA, PROTEÍNAS Y LDH Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGÉNESIS

		b-FGF	VEGF-I	VEGF-t	TSP-1	Endostatina
Ph	r	- 0,573	- 0,306	- 0,316	- 0,438	
	p	< 0.001	0.005	0.004	< 0.001	
Glucosa	r	- 0,326	- 0,234	- 0,264	- 0,312	
	p	0.003	0.033	0.016	0.004	
Proteínas	r					
	p					
LDH	r	0,580	0,469	0,444	0,478	
	p	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	

r : coeficiente de correlación de Spearman

2.1.2. CORRELACION ENTRE EL RECUENTO CELULAR Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGENESIS (Tabla 16)

El b-FGF fue el único que se correlacionó con el número total de leucocitos ($p = 0.002$), y a su vez mostró una fuerte correlación con el recuento diferencial de neutrófilos. El VEGF y la TSP-1 se correlacionaron de forma positiva con el recuento diferencial de neutrófilos y de forma negativa con el recuento de linfocitos. La endostatina no mostró ningún tipo de correlación.

TABLA 16. CORRELACIÓN ENTRE NÚMERO TOTAL DE LEUCOCITOS, RECUENTO DE NEUTRÓFILOS Y DE LINFOCITOS Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGÉNESIS

		b-FGF	VEGF-I	VEGF-t	TSP-1	Endostatina
Leucocitos	r	0,342				
	p	0.002				
Neutrófilos	r	0,458		0,245	0,317	
	p	< 0.001		0.026	0.004	
Linfocitos	r		- 0,338	- 0,283	- 0,249	
	p		0.002	0.010	0.024	

r : coeficiente de correlación de Spearman

2.1.3. CORRELACION ENTRE LOS MARCADORES INFLAMATORIOS Y DE ACTIVIDAD NEUTROFÍLICA Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGENESIS (Tabla 17)

La elastasa y la IL-8 presentaron correlación positiva con los activadores de la angiogénesis y la TSP-1. El TNF-alfa se correlacionó con el b-FGF y la TSP-1.

TABLA 17. CORRELACIÓN ENTRE ELASTASA, IL-8 Y TNF-alfa Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGÉNESIS

		b-FGF	VEGF-I	VEGF-t	TSP-1	Endostatina
Elastasa	r	0,658	0,353	0,363	0,467	
	p	< 0.001	0.001	0.001	< 0.001	
IL-8	r	0,581	0,550	0,612	0,633	- 0,231
	p	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.036
TNF-alfa	r	0,242			0,333	
	p	0.024			0.002	

r : coeficiente de correlación de Spearman

2.1.4. CORRELACION ENTRE EL SISTEMA DE LA FIBRINOLISIS Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGENESIS (Tabla 18)

Los factores angiogénicos y la TSP-1 se correlacionaron fuertemente de forma positiva con los factores inhibidores de la fibrinólisis y el u-PA y de forma negativa con el activador t-PA. La endostatina mostró un comportamiento inverso de forma significativa con el t-PA.

TABLA 18. CORRELACIÓN ENTRE EL SISTEMA DE LA FIBRINOLISIS Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGÉNESIS

		b-FGF	VEGF-I	VEGF-t	TSP-1	Endostatina
t-PA	r	- 0,232		- 0,235	- 0,285	0,277
	p	0.033		0.031	0.009	0,011
u-PA	r	0,283	0,613	0,500	0,373	
	p	0.009	< 0.001	< 0.001	< 0.001	
PAI-1 Ag	r	0,278	0,540	0,500	0,518	
	p	0.011	< 0.001	< 0.001	< 0.001	
PAI-2 Ag	r	0,357	0,379	0,417	0,454	
	p	0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	

r : coeficiente de correlación de Spearman

2.1.5. CORRELACION ENTRE EL SISTEMA DE LAS METALOPROTEINASAS Y LA ANGIOGENESIS (Tabla 19)

La correlación entre los factores angiogénicos y la TSP-1 fue positiva para con la MMP-9 y negativa para con la MMP-2. La endostatina mostró una correlación positiva con la MMP-2 y no se correlacionó con la MMP-9.

TABLA 19. CORRELACIÓN ENTRE EL SISTEMA DE LAS METALOPROTEINASAS Y LA ANGIOGÉNESIS

		b-FGF	VEGF-I	VEGF-t	TSP-1	Endostatina
MMP-2	r	- 0,410		- 0,345	- 0,365	0,403
	p	< 0.001		0.001	0.001	< 0.001
MMP-9	r	0,425	0,366	0,292	0,480	
	p	< 0.001	0.001	0.007	< 0.001	
TIMP-1	r		0,266			
	p		0.014			
TIMP-2	r				0,256	- 0,250
	p				0.019	0.022

r : coeficiente de correlación de Spearman

2.2. DERRAMES PLEURALES INFECCIOSOS TIPO EMPIEMA Y PARANEUMÓNICOS COMPLICADOS Y NO COMPLICADOS

2.2.1. CORRELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS HABITUALES Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGÉNESIS (Tabla 20)

En el grupo de derrames pleurales infecciosos tipo empiema y paraneumónicos complicados y no complicados se objetiva una fuerte correlación entre los factores angiogénicos y el inhibidor TSP-1 con los niveles bajos de pH y de glucosa y los niveles elevados de LDH. La endostatina no se correlacionó con ninguno de los marcadores estudiados.

TABLA 20. CORRELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS HABITUALES Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGÉNESIS

		b-FGF	VEGF-I	VEGF-t	TSP-1	Endostatina
Ph	r	- 0,661	- 0,515	- 0,500	- 0,688	
	P	< 0.001	0.001	0.001	< 0.001	
Glucosa	r	- 0,395	- 0,362	- 0,395	- 0,378	
	P	0.011	0.020	0.011	0.015	
Proteínas	r					
	P					
LDH	r	0,612	0,495	0,542	0,599	
	P	< 0.001	0.001	<0.001	< 0.001	
ADA	r	0,328				
	P	0.041				

r : coeficiente de correlación de Spearman

2.2.2. CORRELACION ENTRE EL RECuento CELULAR Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGENESIS (Tabla 21)

El número total de leucocitos en el líquido pleural de los derrames paraneumónicos se correlacionó débilmente con el factor angiogénico b-FGF.

El recuento diferencial de neutrófilos mostró una correlación positiva con los factores angiogénicos bFGF y VEGF total y la TSP-1. El recuento de linfocitos mostró una correlación negativa con el VEGF tanto en su forma total como libre y con la TSP-1 y positiva con la endostatina.

TABLA 21. CORRELACION ENTRE EL RECUESTO CELULAR Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGENESIS

		b-FGF	VEGF-I	VEGF-t	TSP-1	Endostatina
Leucocitos	r	0,389				
	p	0.012				
Neutrófilos	r	0,452		0,405	0,331	
	p	0.003		0.010	0,037	
Linfocitos	r		- 0,437	- 0,338	- 0,374	0,330
	p		0.005	0,033	0.018	0.038

r : coeficiente de correlación de Spearman

2.2.3. CORRELACION ENTRE LOS MARCADORES INFLAMATORIOS Y DE ACTIVIDAD NEUTROFÍLICA Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGENESIS (Tabla 22)

Los factores activadores de la angiogénesis y el inhibidor TSP-1 mostraron correlación con los tres marcadores de inflamación (elastasa polimorfonuclear, IL-8 y TNF-alfa). La endostatina se correlació de forma negativa con la elastasa y la IL-8.

TABLA 22. CORRELACION ENTRE LOS MARCADORES INFLAMATORIOS Y DE ACTIVIDAD NEUTROFÍLICA Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGENESIS

		b-FGF	VEGF-I	VEGF-t	TSP-1	Endostatina
Elastasa	r	0,752	0,585	0,571	0,712	- 0,319
	p	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.042
IL-8	r	0,611	0,595	0,675	0,740	- 0,382
	p	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.012
TNF-alfa	r	0,450	0,395	0,356	0,708	
	p	0.003	0.010	0.021	< 0.001	

r : coeficiente de correlación de Spearman

2.2.4. CORRELACION ENTRE EL SISTEMA DE LA FIBRINOLISIS Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGENESIS (Tabla 23)

Se observó correlación positiva entre los factores inhibidores de la fibrinólisis PAI-1 Ag y PAI-2 Ag y el u-PA con los factores angiogénicos b-FGF y VEGF y con el inhibidor TSP-1. La endostatina mostró correlación con el activador t-PA.

TABLA 23. CORRELACION ENTRE EL SISTEMA DE LA FIBRINOLISIS Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGENESIS

		b-FGF	VEGF-I	VEGF-t	TSP-1	Endostatina
t-PA	r			- 0,372	- 0,375	0,540
	p			0.015	0.014	< 0.001
u-PA	r	0,508	0,681	0,557	0,570	
	p	0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	
PAI-1 Ag	r	0,452	0,820	0,749	0,786	
	p	0.003	< 0.001	< 0.001	< 0.001	
PAI-2 Ag	r	0,350	0,509	0,511	0,493	
	p	0.023	0.001	0.001	0.001	

r : coeficiente de correlación de Spearman

2.2.5. CORRELACION ENTRE EL SISTEMA DE LAS METALOPROTEINASAS Y LA ANGIOGENESIS (Tabla 24)

Se observó una correlación negativa entre los factores activadores de la angiogénesis y la TSP-1 y la MMP-2 y positiva con la MMP-9. La endostatina se correlacionó de forma positiva con la MMP-2. Los inhibidores de las metaloproteinasas TIMP-1 y TIMP-2 se correlacionaron de forma positiva con el VEGF y con la TSP-1.

TABLA 24. CORRELACION ENTRE EL SISTEMA DE LAS METALOPROTEINASAS Y LA ANGIOGENESIS

		b-FGF	VEGF-I	VEGF-t	TSP-1	Endostatina
MMP-2	r	- 0,440	- 0,338	- 0,500	- 0,503	0,529
	p	0.004	0.029	0.001	0.001	< 0.001
MMP-9	r	0,444	0,627	0,512	0,586	
	p	0.003	< 0.001	0.001	< 0.001	
TIMP-1	r		0,540	0,378	0,409	
	p		< 0.001	0.013	0.007	
TIMP-2	r		0,412	0,366	0,456	
	p		0.007	0.017	0.002	

r : coeficiente de correlación de Spearman

2.3. DERRAMES PLEURALES TUBERCULOSOS

2.3.1. CORRELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS HABITUALES Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGÉNESIS (Tabla 25)

Se constató correlación entre el b-FGF y los niveles bajos de pH y altos de LDH.

TABLA 25. CORRELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS HABITUALES Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGÉNESIS

		b-FGF	VEGF-I	VEGF-t	TSP-1	Endostatina
Ph	r	- 0,561				
	p	0.010				
Glucosa	r					
	p					
Proteínas	r					
	p					
LDH	r	0,466				
	p	0.033				

r : coeficiente de correlación de Spearman

2.3.2. CORRELACION ENTRE EL RECUESTO CELULAR, LOS MARCADORES INFLAMATORIOS Y DE ACTIVIDAD NEUTROFÍLICA, EL SISTEMA DE LA FIBRINOLISIS, EL SISTEMA DE LAS METALOPROTEINASAS Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGENESIS

No se constató ninguna correlación.

2.4. DERRAMES PLEURALES NEOPLÁSICOS

2.4.1. CORRELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS HABITUALES Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGÉNESIS

En los derrames pleurales neoplásicos destacó una correlación positiva entre el VEGF, tanto en su forma total como libre, y los niveles elevados de LDH.

2.4.2. CORRELACION ENTRE EL RECUESTO CELULAR Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGENESIS

No se observó ningún tipo de correlación.

2.4.3. CORRELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES INFLAMATORIOS Y DE ACTIVIDAD NEUTROFÍLICA Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGÉNESIS (Tabla 26)

Se objetivó correlación entre la forma total y libre del VEGF y la IL-8 y el b-FGF y la elastasa polimorfonuclear.

TABLA 26. CORRELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES INFLAMATORIOS Y DE ACTIVIDAD NEUTROFÍLICA Y EL SISTEMA DE LA ANGIOGÉNESIS

		b-FGF	VEGF-l	VEGF-t	TSP-1	Endostatina
Elastasa	r	0,601				
	p	0.004				
IL-8	r		0,797	0,713		
	p		< 0.001	< 0.001		
TNF-alfa	r					
	p					

r : coeficiente de correlación de Spearman

2.4.4. CORRELACIÓN ENTRE EL SISTEMA DE LA FIBRINOLISIS Y LA ANGIOGENESIS (Tabla 27)

Los factores activadores de la angiogénesis mostraron una correlación positiva con el u-PA en los derrames pleurales neoplásicos. El VEGF libre y la TSP-1 se correlacionaron con el PAI-1 Ag. El PAI-2 Ag se correlacionó con los factores angiogénicos y con la TSP.

TABLA 27. CORRELACIÓN ENTRE EL SISTEMA DE LA FIBRINOLISIS Y LA ANGIOGENESIS

		b-FGF	VEGF-l	VEGF-t	TSP-1	Endostatina
t-PA	r p					
u-PA	r p	0,561 0.008	0,804 < 0.001	0,613 0.003		
PAI-1 Ag	r p		0,474 0.030		0,614 0.003	
PAI-2 Ag	r p	0,476 0.029	0,435 0.049	0,556 0.009	0,596 0.004	

r : coeficiente de correlación de Spearman

2.4.5. CORRELACIÓN ENTRE EL SISTEMA DE LAS METALOPROTEINASAS Y LA ANGIOGENESIS (Tabla 28)

Los factores activadores de la angiogénesis y la TSP-1 se correlacionaron de forma positiva con el TIMP-1 y el b-FGF con la MMP-9.

TABLA 28. CORRELACIÓN ENTRE EL SISTEMA DE LAS METALOPROTEINASAS Y LA ANGIOGENESIS

		b-FGF	VEGF-I	VEGF-t	TSP-1	Endostatina
MMP-2	r p					
MMP-9	r p	0,461 0.036				
TIMP-1	r p	0,574 0.006	0,512 0.018	0,521 0.015	0,488 0.025	
TIMP-2	r p					

r : coeficiente de correlación de Spearman

2.5. DERRAMES PLEURALES TRASUDADOS

A excepción de la correlación entre los niveles de VEGF libre y total con los valores bajos de glucosa, en los derrames pleurales trasudados secundarios a insuficiencia cardíaca no se objetivó ninguna correlación entre los factores implicados en la angiogénesis y el resto de los marcadores bioquímicos habituales, el recuento celular, los marcadores inflamagtorios y de actividad neutrofílica, el sistema de la fibrinólisis ni el sistema de las metaloproteinasas.

DISCUSIÓN

1. EQUILIBRIO DE LOS FACTORES ACTIVADORES E INHIBIDORES DE LA ANGIOGÉNESIS EN EL LÍQUIDO PLEURAL

La angiogénesis o neoformación de vasos es un sistema estrictamente regulado y que es fundamental durante la reproducción y el desarrollo embrionarios. En la vida postnatal y adulta es un proceso limitado y es esencial en determinados procesos como la reparación de heridas. Sin embargo, la disregulación entre los factores activadores e inhibidores que modulan el proceso de la angiogénesis da lugar a la angiogénesis patológica, que suele ser persistente y se ha visto implicada en procesos inflamatorios crónicos e infecciosos y en el crecimiento y progresión tumorales.

En la patogenia de los derrames pleurales es poco lo que se sabe acerca de la relación de los factores implicados en la angiogénesis en los diferentes tipos de derrame pleural y su asociación con otras citoquinas proinflamatorias.

Factores angiogénicos como el VEGF y el b-FGF son potencialmente buenos candidatos para la formación de líquido en el espacio pleural dada su implicación en los procesos de inducción de neovascularización, permeabilidad vascular y hemorragia (205). Los estudios revisados coinciden en la importancia del VEGF en la patogénesis de la acumulación de líquido pleural, especialmente en el contexto de patología maligna (150,160,161,205,207-212). La implicación del b-FGF en la patogenia de los derrames pleurales ha sido menos estudiada; Strizzi (206) destaca un papel más relevante del b-FGF en los derrames pleurales benignos que en los malignos, mientras que un trabajo de Ishimoto (205) cuestiona su implicación en la patogenia de la formación de líquido pleural. No hemos encontrado referencias en la literatura revisada acerca de la implicación de factores angiostáticos como la endostatina y la TSP-1 en la patogenia de los derrames pleurales.

La presencia de receptores para el VEGF en las células mesoteliales pleurales indica un potente mecanismo para la actividad biológica de este

factor en el tejido pleural (230). Los trabajos acerca del VEGF en la patogenia de los derrames pleurales coinciden, al igual que nuestros resultados, que esta citoquina angiogénica se halla más elevada en los exudados que en los trasudados, siendo producida tanto por células tumorales como por células inflamatorias y reafirmando su importante implicación en la formación de los derrames pleurales exudados (155,160,161).

La hipoxia es un factor que estimula la neoformación de vasos (157,158). A nivel pleural, sin embargo, parece que la hipoxia y la isquemia no juegan un papel demasiado importante como factores potenciadores de la angiogénesis, excepto en los casos de tromboembolismo pulmonar (160). El óxido nítrico (que puede ser producido por las células mesoteliales), la hipoglucemia y la acidosis también son inductores de VEGF (50,148,161,167,232,233). En nuestro trabajo, podemos observar como los niveles bajos de pH y de glucosa, característicos de los derrames pleurales tipo empiema y paraneumónicos complicados, se correlacionan fuertemente con los niveles de VEGF. Asimismo, y coincidiendo con el trabajo de Momi (213), hemos constatado una correlación positiva del VEGF con los niveles de LDH.

En los derrames pleurales exudados el VEGF se correlaciona con el recuento diferencial de linfocitos y de neutrófilos. Este resultado se enfrenta a la teoría que defiende que la principal fuente de VEGF en los derrames pleurales son las células mesoteliales y no los leucocitos (209,214).

En nuestro trabajo hemos podido objetivar como los valores más bajos de VEGF los presentan los derrames pleurales trasudados; Cheng (160) apunta que los valores de VEGF pleurales en los pacientes con insuficiencia cardíaca son similares a los valores de VEGF de suero de pacientes sanos

control y por tanto aboga que la producción de VEGF en este grupo de pacientes podría ser a nivel de la circulación sanguínea. En nuestro trabajo, los niveles de VEGF en los derrames trasudados no presentan ningún tipo de asociación con el recuento celular, el pH ni la LDH, y como discutiremos más adelante tampoco con los marcadores de actividad inflamatoria, el sistema de la fibrinólisis ni el de las metaloproteinasas; en cambio sí ha mostrado niveles superiores en el espacio pleural respecto al plasma.

Dentro del grupo de los exudados, y coincidiendo con los resultados de Thickett (161), los empiemas y paraneumónicos complicados son los que presentan los niveles más elevados de VEGF, tanto en su forma total como libre. Adicionalmente, hemos encontrado diferencias significativas en los valores de VEGF entre este grupo y los derrames pleurales paraneumónicos no complicados ($p < 0.001$), y por tanto el VEGF podría ser un parámetro útil en la diferenciación entre ambas categorías de derrame pleural, con la consecuente implicación terapéutica. Mohammed (50) observa como los empiemas contienen niveles 5 veces superiores de VEGF que los derrames paraneumónicos no complicados.

Los trabajos acerca del derrame pleural maligno coinciden en la importancia del VEGF en los derrames pleurales neoplásicos y observan niveles más elevados de este factor en los derrames pleurales malignos que en los benignos, a la vez que se correlaciona con la progresión tumoral, el pronóstico, con la respuesta al tratamiento y se propone su utilización como un marcador más de patología pleural maligna (160,161,210,213). En nuestro trabajo la mediana de VEGF en los derrames pleurales neoplásicos fue superior al del grupo de los derrames infecciosos en conjunto (empiemas y

paraneumónicos complicados, paraneumónicos no complicados, tuberculosos) pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. A pesar de ello, en nuestra serie de derrames neoplásicos destacan tres pacientes con niveles pleurales de VEGF mucho más elevados que el resto (>15000 pg/ml), tratándose de pacientes con cáncer de pulmón. En el trabajo de Yanagawa (150) se demuestra la importancia del VEGF en los pacientes con cáncer de pulmón, independientemente del tipo histológico y/ o el estadio clínico, mientras que en aquellos con tumores de otras localizaciones presentan niveles pleurales de VEGF más heterogéneos y bajos, sugiriendo que tendrían que examinarse otros factores en estos casos. Cuando analizamos en nuestra serie los diferentes grupos etiológicos, ni los derrames paraneumónicos bacterianos ni los tuberculosos muestran diferencias con los neoplásicos, en cambio los empiemas y paraneumónicos complicados presentan niveles más elevados de VEGF-total que los neoplásicos ($p = 0.038$), mientras que los neoplásicos presentan niveles más elevados de VEGF-total que los derrames paraneumónicos no complicados ($p = 0.04$). El grupo de los empiemas y paraneumónicos complicados presentan niveles significativamente más elevados de VEGF que los tuberculosos ($p < 0.005$), mientras que no existen diferencias entre los derrames paraneumónicos no complicados y los tuberculosos. Así, y coincidiendo con la propuesta de Thickett (161), los valores elevados de VEGF (> 1000 pg/ml) sugieren patología maligna o empiema.

El b-FGF ha sido menos estudiado a nivel pleural e incluso, como ya hemos mencionado anteriormente existe un trabajo que cuestiona su implicación en la formación y acumulación de líquido pleural (205). En nuestro

trabajo, el b-FGF se comporta de forma similar al VEGF, sugiriendo que sí participa en la patogenia de los exudados pleurales. Adicionalmente, y como discutiremos más adelante, se asocia con los marcadores de actividad neutrofílica y los sistemas de la fibrinólisis y de las metaloproteinasas.

Queremos destacar, y en comparación con el VEGF, que el b-FGF sí muestra niveles significativamente más elevados en el conjunto de los derrames infecciosos al compararlos con los neoplásicos ($p = 0.007$). Este resultado podría coincidir con los del trabajo de Strizzi (206), donde se observa que el b-FGF está más elevado en la patología pleural benigna que en los derrames malignos. Además, en nuestro trabajo hemos observado como el b-FGF se halla más elevado en el conjunto de los derrames pleurales paraneumónicos que en los tuberculosos ($p = 0.003$). En los exudados pleurales, el b-FGF también se correlaciona con los niveles bajos de glucosa y de pH, los valores altos de LDH y con el recuento de neutrófilos. La buena correlación que observamos entre el b-FGF y el recuento de neutrófilos ($r: 0.458 / p < 0.001$). podría sugerir que una de las principales fuentes de b-FGF en los exudados pleurales podrían ser los leucocitos polimorfonucleares

La endostatina ha demostrado ser un potente inhibidor de la angiogénesis y del crecimiento tumoral in vivo, pero a nuestro saber, no se ha estudiado su implicación en la fisiopatología de los derrames pleurales. En nuestro trabajo hemos observado que la endostatina se halla ligeramente más elevada en los exudados que en los trasudados sin significancia estadística. Tampoco hemos hallado diferencias significativas de los valores de endostatina entre los derrames pleurales infecciosos y los neoplásicos. La única diferencia destacable la hemos encontrado dentro del grupo de los derrames pleurales

paraneumónicos, donde la endostatina, al contrario que los factores activadores de la angiogénesis VEGF y b-FGF, muestra niveles más bajos en los del grupo empiema y paraneumónico complicado respecto a los paraneumónicos no complicados ($p = 0.002$).

El segundo inhibidor de la angiogénesis que hemos estudiado ha sido la TSP-1. El efecto angiostático de la TSP-1 ha sido demostrado tanto in vitro como in vivo. A pesar de ello, cada vez existen más evidencias que la TSP-1 puede ser más bien un modulador natural de la angiogénesis. Así, dominaría una regulación positiva, es decir una acción fundamentalmente angiogénica, o negativa, es decir una acción fundamentalmente angiostática, dependiendo del contexto y de la concentración de la misma (128,172,179-183). No hemos encontrado referencias previas acerca del comportamiento de la TSP-1 en la patogenia de los derrames pleurales.

En nuestro trabajo hemos observado como la TSP-1 se comporta de forma paralela y similar a los factores activadores de la angiogénesis VEGF y b-FGF. Así, se encuentra más elevada en los exudados que en los trasudados ($p < 0.001$), en los empiemas y paraneumónicos complicados que en los neoplásicos ($p < 0.001$), y en el grupo de los empiemas y paraneumónicos complicados que en los paraneumónicos no complicados ($p < 0.001$). Paralelamente, y al igual que los factores angiogénicos, la TSP-1 en los exudados pleurales se asocia con los niveles bajos de glucosa y de pH, con los niveles elevados de LDH así como con el recuento diferencial de neutrófilos ($p = 0.004$) y de linfocitos ($p = 0.024$). Estos resultados apoyan la teoría que defiende que la TSP-1 es más bien un modulador que un inhibidor de la angiogénesis. Así, en el espacio pleural y en el contexto de los derrames

exudados la TSP-1 parece comportarse como un factor estimulador de la angiogénesis, aunque serían necesarios más estudios y su valoración en cultivos celulares para poder corroborar este hecho.

2. LOS FACTORES ACTIVADORES E INHIBIDORES DE LA ANGIOGÉNESIS EN PLASMA Y LÍQUIDO PLEURAL

A nivel plasmático también hemos podido observar resultados interesantes de los factores implicados en la angiogénesis dentro del contexto de pacientes con patología pleural. El VEGF y la TSP-1 plasmáticos presentan niveles superiores en exudados que en trasudados ($p = 0.003$ y $p = 0.010$ respectivamente), mientras que la endostatina plasmática es superior en los trasudados que en los exudados ($p < 0.001$). No hemos observado diferencias en los niveles plasmáticos de VEGF, b-FGF, TSP-1 ni endostatina entre los pacientes con derrame pleural infeccioso vs los pacientes con derrame pleural maligno. De forma similar, Ishimoto (205) no encuentra diferencias entre los niveles séricos de VEGF de los pacientes con enfermedades pleurales inflamatorias y los pacientes con patología maligna; por el contrario, en el trabajo de Momi (213), los pacientes con derrame pleural maligno muestran niveles séricos de VEGF significativamente más elevados que el resto.

Dentro del grupo de pacientes con derrame pleural paraneumónico, se han observado diferencias entre aquellos con empiema y derrame paraneumónico complicado vs los pacientes con derrame paraneumónico no complicado. Así, en los pacientes con empiema y derrame paraneumónico complicado, la mediana de las cifras plasmáticas de VEGF son superiores que en los pacientes con derrame pleural paraneumónico no complicado ($p = 0.036$). En cuanto a los factores inhibidores de la angiogénesis, la TSP-1 se comporta igual que la endostatina y ambas muestran niveles plasmáticos más elevados en los pacientes con derrame pleural paraneumónico no complicado

que en aquellos con empiema y derrame pleural paraneumónico complicado ($p = 0.014$ y $p = 0.024$ respectivamente).

Respecto a las diferencias que pueden existir entre los niveles pleurales y plasmáticos de los factores implicados en la angiogénesis, en el trabajo de Momi (213) vemos como los niveles de VEGF en los pacientes con derrame pleural paraneumónico, tuberculoso o maligno, están más elevados en pleura que en plasma ($p < 0.001$). En nuestro trabajo, los valores de VEGF total y libre en todas las categorías estudiadas de derrame pleural exudado son significativamente superiores en el líquido pleural que en el plasma. En el grupo de los trasudados, aunque el VEGF también es superior en el líquido pleural que en el plasma, las diferencias son menos acusadas que en los exudados. Con este resultado no podemos confirmar del todo que el VEGF en los trasudados se produzca en la sangre, tal y como se sugiere en uno de los trabajos de Cheng (160).

Los valores de b-FGF sólo son superiores en pleura respecto al plasma en el grupo de los empiemas y paraneumónicos complicados ($p < 0.001$). En el resto de categorías, los niveles pleurales y plasmáticos de b-FGF son similares. Llama la atención que en el grupo de trasudados los niveles plasmáticos de b-FGF son significativamente superiores que los pleurales (a pesar que la mediana es de 3 pg/ml en ambos, el rango en plasma oscila entre 3,00 y 19,70 y en pleura entre 3,00 y 4,00 pg/ml). Este resultado refuerza nuestra hipótesis que a nivel de líquido pleural los leucocitos polimorfonucleares podrían ser una de las principales fuentes de b-FGF.

Los valores pleurales de endostatina son ligeramente superiores respecto al plasma en todos los grupos de exudado pleural, pero sólo en los

tuberculosos esta diferencia es significativa ($p = 0.016$). En los trasudados, en cambio, la endostatina es superior en plasma que en el líquido pleural de forma claramente significativa ($p = 0.002$).

Al analizar la TSP-1 hemos observado tanto en los exudados como en los trasudados que los niveles están más elevados en el plasma que en el líquido pleural, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) excepto en el grupo de los empiemas y paraneumónicos complicados ($p > 0.05$).

Al analizar la asociación de los factores angiogénicos y angiostáticos entre plasma y líquido pleural no encontramos correlación en ninguno de los grupos etiológicos para VEGF, b-FGF y TSP-1. La endostatina, en cambio, mantiene correlación entre los niveles pleurales y plasmáticos en el grupo de los derrames pleurales tipo empiema y paraneumónicos complicados ($p < 0.003$) y paraneumónicos no complicados ($p < 0.001$). La ausencia de correlación entre los niveles pleurales y plasmáticos de VEGF, b-FGF y TSP-1 sugiere una respuesta compartimentalizada de estos factores a nivel del espacio pleural.

3. ASOCIACIÓN ENTRE LOS FACTORES ACTIVADORES E INHIBIDORES DE LA ANGIOGENESIS Y LOS MARCADORES INFLAMATORIOS Y DE ACTIVIDAD NEUTROFÍLICA, EL SISTEMA DE LA FIBRINOLISIS Y DE LAS METALOPROTEINASAS EN LÍQUIDO PLEURAL

La inflamación y la angiogénesis están fuertemente relacionadas y pueden considerarse codependientes la una de la otra; de hecho la inflamación puede promover la angiogénesis a través de la liberación de factores angiogénicos y de enzimas proteolíticos (174,188,196,229). Durante el desarrollo de los derrames pleurales exudados, mecanismos inflamatorios y fibrinolíticos han demostrado contribuir a la acumulación de líquido y los enzimas proteolíticos de membrana han demostrado tener un papel esencial en la inflamación. En este sentido, se ha observado la importancia del balance entre los enzimas proteolíticos y antiproteolíticos en la patogenia de las enfermedades pleurales. En este campo cabe destacar el sistema de las metaloproteinasas, que destruyen la matriz extracelular, abriendo camino a la neoformación de vasos a través de un sistema estrictamente regulado como es la angiogénesis.

Citoquinas como el TNF-alfa y la IL-8 son factores angiogénicos y tienen la capacidad de estimular los neutrófilos a producir VEGF, mientras que el TGF- β se muestra como la citoquina más potente y consistente en la liberación del VEGF por parte de las células mesoteliales pleurales (155,161,214-216). Adicionalmente, el factor tisular, expresado en las células mesoteliales pleurales inflamadas, ha sido identificado como un factor regulador de la angiogénesis y con capacidad de inducir la producción de VEGF (137-139,231). Adicionalmente, el VEGF puede modular la respuesta procoagulante al TNF (133). La elastasa polimorfonuclear influye indirectamente en la angiogénesis facilitando la migración celular endotelial y posterior proliferación vascular (151,152,164). En el trabajo de Momi (213) se observa una correlación positiva entre el VEGF y las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , sICAM-1 y TNF- α en los exudados pleurales, mientras que en los trasudados no se observa ninguna correlación. Nuestros resultados ponen de manifiesto una correlación positiva entre los marcadores inflamatorios elastasa polimorfonuclear, IL-8 y TNF- α y los factores angiogénicos en la patogénesis de los derrames pleurales exudados. Así vemos como en los exudados

pleurales el VEGF (total y libre) se correlaciona con la elastasa y la IL-8, y el b-FGF y la TSP-1 con la elastasa, la IL-8 y el TNF-alfa. El factor angiostático endostatina se correlaciona de forma negativa con los marcadores de actividad inflamatoria estudiados, pero de forma significativa únicamente con la IL-8 ($p = 0.036$).

Al analizar los diferentes grupos etiológicos, hemos visto como en los derrames paraneumónicos (empiema, paraneumónicos complicados y paraneumónicos no complicados), el VEGF, el b-FGF y la TSP-1 se correlacionan de forma positiva con los tres marcadores de actividad inflamatoria estudiados, mientras que el factor inhibidor endostatina se correlaciona de forma negativa con la elastasa y la IL-8. En los derrames malignos observamos correlación positiva entre el VEGF y la IL-8 y entre el b-FGF y la elastasa polimorfonuclear.

En definitiva, estos resultados ponen de manifiesto que existe una asociación entre los marcadores inflamatorios y el sistema de la angiogénesis en la patogenia de los exudados pleurales.

La degradación de la matriz extracelular es imprescindible para la angiogénesis y requiere tanto del sistema de la fibrinólisis como del sistema de las metaloproteinasas. Estudios realizados por nuestro grupo han puesto de manifiesto la importante relación que existe entre el sistema de la fibrinólisis y el de las metaloproteinasas en la fisiopatología de los derrames pleurales (123). No hemos encontrado estudios previos que valoren la relación entre el sistema de la fibrinólisis ni el de las metaloproteinasas con el sistema de la angiogénesis en la patogenia de los derrames pleurales. Los resultados del presente trabajo ponen de manifiesto una asociación entre los sistemas de la fibrinólisis y de las metaloproteinasas con la angiogénesis en la fisiopatología de los exudados pleurales.

Hemos observado que en los exudados pleurales existe una asociación entre el sistema de la angiogénesis y el sistema de la fibrinólisis. El VEGF, el b-FGF y la TSP-1 presentan una correlación positiva con los factores inhibidores del plasminógeno PAI-1 y PAI-2, que en parte son los responsables del depósito de fibrina al inhibir su degradación. Por otro lado, existe una correlación negativa entre los factores VEGF, b-FGF y TSP-1 con el activador tisular del plasminógeno t-PA, que es el que permite la degradación de la fibrina. La endostatina se comporta de forma inversa. Este comportamiento se mantiene en el grupo de los derrames pleurales paraneumónicos, es decir, se mantiene una asociación positiva entre los factores activadores de la angiogénesis y los inhibidores de la degradación de la fibrina y una asociación negativa con el t-PA que es el que permite su degradación, lo cual puede conducir a la presencia de complicaciones locales en forma de paquipleuritis. En los derrames tuberculosos sólo encontramos una asociación significativa entre la TSP-1 y el PAI-1 y en los derrames pleurales neoplásicos también destacó una correlación positiva entre los factores angiogénicos y los inhibidores de la fibrinólisis.

La distribución de las metaloproteinasas juega un papel clave en la degradación de la matriz y su asociación con los factores angiogénicos es importante en los procesos de neovascularización. La MMP-9 ha demostrado estimular la liberación de VEGF desde las reservas extracelulares (162). Estudios realizados por nuestro grupo sugieren que la MMP-9, al igual que la MMP-1 y MMP-8, juega un papel importante en la fisiopatología de los derrames pleurales exudados, especialmente en los paraneumónicos complicados y empiemas (123). Así, hemos observado que las

metaloproteinasas MMP-1, MMP-8 y MMP-9 estimulan la degradación de la matriz extracelular y presentan una asociación positiva con los marcadores de actividad inflamatoria y los inhibidores de la activación del plasminógeno. La MMP-2, por el contrario, se asocia de forma negativa con la elastasa y la IL-8 y de forma positiva con el factor tisular activador del plasminógeno t-PA (123). En el presente estudio hemos observado como en los derrames pleurales exudados existe una correlación positiva entre los factores VEGF, b-FGF y TSP-1 y la MMP-9 y una correlación negativa con la MMP-2. La endostatina se correlaciona de forma positiva con la MMP-2. En el grupo de los derrames pleurales paraneumónicos existe el mismo patrón de correlación; paradójicamente en este grupo el VEGF y la TSP-1 también se correlacionan de forma positiva con el TIMP-1 y el TIMP-2, ambos factores con actividad antiangiogénica. En los derrames pleurales tuberculosos y neoplásicos no hemos encontrado resultados destacables.

4. RELACIÓN DEL SISTEMA DE LA ANGIOGÉNESIS CON LA PRESENCIA DE COMPLICACIONES PLEURALES LOCALES EN LOS DERRAMES PLEURALES PARANEUMÓNICOS

Hemos observado niveles muy elevados de VEGF, b-FGF y TSP-1 en los derrames pleurales tipo empiema y paraneumónicos complicados. Adicionalmente, en el conjunto de derrames pleurales paraneumónicos hemos observado su asociación con los niveles bajos de pH y de glucosa y los valores elevados de LDH, los marcadores inflamatorios y de actividad neutrofílica (elastasa polimorfonuclear, TNF- α , IL-8), el sistema de la fibrinolisis y el de las metaloproteinasas, todos ellos implicados en la aparición de complicaciones locales en los derrames pleurales infecciosos.

En la evolución de los derrames pleurales bacterianos, desde una fase inicial estéril hasta la fase final organizativa, se produce una invasión del espacio pleural por células inflamatorias y bacterias así como un depósito de fibrina que favorecerá la formación de adherencias y loculaciones entre las dos hojas pleurales. La activación de factores de la coagulación con depósito de fibrina y la proliferación de fibroblastos dará lugar a la formación de membranas inelásticas que comportarán importantes secuelas anatómicas y funcionales del pulmón y la caja torácica. En todo este proceso intervienen sustancias con actividad inflamatoria entre las que se pueden incluir las citoquinas angiogénicas, que actuarían sobretodo a nivel de permeabilidad vascular y neoformación de vasos.

La presencia de paquipleuritis residual se traducirá radiológicamente en forma de engrosamiento pleural, y se considera un indicador de complicaciones pleurales tardías en los derrames pleurales infecciosos, tanto paraneumónicos como tuberculosos (41,42,234-236).

En nuestra serie de derrames pleurales paraneumónicos (n = 42) observamos la presencia de paquipleuritis (engrosamiento pleural ≥ 10 mm en la radiografía posteroanterior de tórax al finalizar el tratamiento) en el 38,1% de los casos.

Al analizar la relación del sistema de la angiogénesis con la presencia de paquipleuritis residual hemos observado que los derrames pleurales paraneumónicos con cifras más altas de factores angiogénicos VEGF total y libre, b-FGF y de TSP-1 presentaron mayor incidencia de paquipleuritis. Así, podríamos considerar que los factores VEGF-total, VEGF-libre, b-FGF y TSP-1 son predictores de la presencia de paquipleuritis en los derrames pleurales

paraneumónicos. No es así en los derrames pleurales tuberculosos donde no hemos encontrado ninguna asociación entre los niveles de factores angiogénicos y la presencia de paquipleuritis al finalizar el tratamiento.

CONCLUSIONES

1. Los derrames pleurales exudados muestran valores significativamente más elevados de los factores implicados en la angiogénesis VEGF, b-FGF y TSP-1 que los trasudados, siendo el grupo de losempiemas y paraneumónicos complicados los que presentan los niveles más altos. Así mismo, no existe correlación entre los niveles pleurales y plasmáticos, sugiriendo una respuesta compartimentalizada a nivel del espacio pleural.
2. En los exudados pleurales existe una correlación positiva entre los factores VEGF, b-FGF y TSP-1 y los niveles bajos de glucosa y de pH, los niveles altos de LDH, los marcadores de actividad inflamatoria elastasa, IL-8 y TNF-alfa, los inhibidores del plasminogeno PAI-1 y PAI-2 y la metaloproteinasa-9, y de forma negativa con el factor activador del plasminógeno t-PA y la metaloproteinasa-2.
3. Los DP bacterianos paraneumónicos con cifras más altas de VEGF, b-FGF y de TSP-1 presentan mayor incidencia de paquipleuritis y así pueden ser factores predictores de la presencia de complicaciones pleurales tardías.
4. Con este trabajo se aportan datos novedosos acerca del papel del sistema de la angiogénesis en la fisiopatología de los derrames pleurales y de su asociación con la inflamación y con otros sistemas implicados como son la fibrinólisis y la matriz extracelular.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Los derrames pleurales son una patología común, aunque su fisiopatología no está del todo aclarada. A pesar de los avances en el manejo diagnóstico y terapéutico, todavía existen derrames pleurales que quedan sin filiar o bien se diagnostican de forma tardía o incorrecta. En la patogenia de los exudados pleurales, sobre todo en los paraneumónicos y empiemas, existe una importante respuesta inflamatoria donde actúan citoquinas y marcadores de actividad inflamatoria como la elastasa, la IL-8 y el TNF-alfa. Asimismo, estudios fisiopatológicos previos han evidenciado la importancia del sistema de la fibrinólisis, la matriz extracelular y el sistema de las metaloproteinasas.

El sistema de la angiogénesis se ha visto implicado en múltiples procesos inflamatorios y neoplásicos, pero ha sido poco estudiado en el espacio pleural.

OBJETIVOS

La disregulación en el sistema de la angiogénesis podría estar implicado en la fisiopatología de los derrames pleurales. Con el presente trabajo nos propusimos estudiar el sistema de la angiogénesis, el equilibrio entre sus activadores e inhibidores en la fisiopatología de los derrames pleurales y su asociación con los marcadores inflamatorios y de actividad neutrofílica, el sistema de la fibrinólisis y la matriz extracelular. Nuestros objetivos fueron los siguientes:

4. Analizar los niveles pleurales y plasmáticos de los factores activadores de la angiogénesis (VEGF total y libre, b-FGF) y de los factores inhibidores de la angiogénesis (endostatina, TSP-1) en los diferentes grupos etiológicos de derrame pleural exudado.
5. Estimar la asociación entre los factores activadores e inhibidores de la angiogénesis y los marcadores bioquímicos habituales (pH, glucosa, LDH), el recuento celular, los marcadores de actividad neutrofílica e inflamación (elastasa polimorfonuclear, IL-8, TNF- α), el sistema de la fibrinólisis (u-PA, t-PA, PAI-1 Ag, PAI-2 Ag) y el sistema de las metaloproteinasas y sus inhibidores tisulares (MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2) en las diferentes categorías de derrame pleural.
6. Estudiar la asociación entre los factores implicados en la angiogénesis y la presencia de complicaciones pleurales en forma de paquipleuritis en los derrames pleurales infecciosos.

PACIENTES Y MÉTODO

Se incluyeron 21 pacientes de cada uno de los siguientes grupos etiológicos de derrame pleural: empiema o derrame pleural paraneumónico complicado, paraneumónico no complicado, tuberculosos, neoplásicos y trasudados secundarios a insuficiencia cardíaca. Se determinaron en sangre y líquido pleural los marcadores bioquímicos habituales (glucosa, proteínas, ADA, LDH, pH), celularidad (leucocitos totales, recuento diferencial de

neutrófilos y de linfocitos), marcadores inflamatorios y de actividad neutrofílica (elastasa, IL-8, TNF-alfa), sistema de la fibrinólisis (u-PA, t-PA, PAI-1, PAI-2), sistema de las metaloproteinasas (MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2) y sistema de la angiogénesis (VEGF total y libre, b-FGF, endostatina y TSP-1). Se utilizó el paquete estadístico SPSS.

RESULTADOS

1. Los DP exudados muestran valores más elevados de factores activadores de la angiogénesis (VEGF total y libre) y b-FGF que los trasudados ($p < 0.001$). Los DP paraneumónicos presentan niveles más elevados de b-FGF que los neoplásicos ($p = 0.007$). La mediana de los niveles pleurales de los factores angiogénicos son superiores en los DP tipo empiema y paraneumónicos complicados que en los DP paraneumónicos no complicados ($p < 0.001$).
2. El factor inhibidor de la angiogénesis endostatina no muestra diferencias significativas en los diferentes grupos etiológicos de DP excepto en el grupo de los DP paraneumónicos. La mediana de los niveles pleurales de endostatina en los DP tipo empiema y paraneumónico complicado (19,2 ng/ml) es inferior que en los DP paraneumónicos no complicados (34,3 ng/ml) ($p = 0.002$). La TSP-1 muestra niveles significativamente superiores en los exudados que en los trasudados ($p < 0.001$) y en los DP paraneumónicos que en los tuberculosos y neoplásicos ($p = 0.001$). La mediana de los valores de TSP-1 en los DP tipo empiema y paraneumónicos complicados son superiores que en los DP paraneumónicos no complicados ($p < 0.001$).

3. En los exudados pleurales existe una correlación positiva entre los factores VEGF, b-FGF y TSP-1 y los niveles bajos de glucosa y de pH y los niveles altos de LDH, la IL-8, la elastasa y el TNF-alfa.
4. En los exudados pleurales existe una asociación positiva entre VEGF, b-FGF y TSP-1 y los inhibidores de la activación del plasminógeno PAI-1 Ag y PAI-2 Ag y la MMP-9 y una asociación negativa con el t-PA y la MMP-2.
5. Excepto para la TSP-1, los factores implicados en la angiogénesis presentan niveles superiores en el espacio pleural que en el plasma. Excepto para la endostatina en el grupo de los derrames paraneumónicos, no se evidencia correlación entre los niveles pleurales y plasmáticos de los factores implicados en la angiogénesis.
6. Los derrames pleurales bacterianos paraneumónicos con cifras más altas de factores angiogénicos presentan mayor incidencia de complicaciones tardías en forma de paquipleuritis.

CONCLUSIONES

1. Los derrames pleurales exudados muestran valores significativamente más elevados de los factores implicados en la angiogénesis VEGF, b-FGF y TSP-1 que los trasudados, siendo el grupo de los empiemas y paraneumónicos complicados los que presentan los niveles más altos. Así mismo, no existe correlación entre los niveles pleurales y plasmáticos, sugiriendo una respuesta compartimentalizada a nivel del espacio pleural.
2. En los exudados pleurales existe una correlación positiva entre los factores VEGF, b-FGF y TSP-1 y los niveles bajos de glucosa y de pH, los niveles

altos de LDH, los marcadores de actividad inflamatoria elastasa, IL-8 y TNF-alfa, los inhibidores del plasminogeno PAI-1 y PAI-2 y la MMP-9, y de forma negativa con el factor activador del plasminógeno t-PA y la MMP-2.

3. Los DP bacterianos paraneumónicos con cifras más altas de VEGF, b-FGF y de TSP-1 presentan mayor incidencia de paquipleuritis y así pueden ser factores predictores de la presencia de complicaciones pleurales tardías.

4. Con este trabajo se aportan datos novedosos acerca del papel del sistema de la angiogénesis en la fisiopatología de los derrames pleurales exudados y de su asociación con la inflamación y con otros sistemas implicados como son la fibrinólisis y la matriz extracelular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Light RW. Pleural diseases. 4th edition. Baltimore. Williams & Wilkins, 2001.
Chapter 1 : Anatomy of the Pleura, pag 1-7.
2. Sahn SA. The pleura. Am Rev Respir Dis 1988 ; 138 : 184-234.
3. Wang NS. Anatomy of the pleura. Clin Chest Med 1998 ; 19 : 229-240.
4. Antony VB, Sahn SA, Mossman B, Gail DB, Kalica A. Pleural cell biology in health and disease. Am Rev Respir Dis 1992 ; 145 : 1236-1239.
5. Kroegel C, Antony VB. Immunobiology of pleural inflammation : potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. Eur Respir J 1997 ; 10 : 2411-2418.
6. Antony VB, Mohammed K. Pathophysiology of pleural Space Infections. Semin Respir Infect 1999 ; 14 : 9-17.
7. Light RW. Pleural diseases. 4th edition. Baltimore. Williams & Wilkins, 2001.
Chapter 2 : Physiology of the Pleural Space, pag 8-20.
8. Light RW. Pleural effusion. N Engl J Med 2002 ; 346 : 1971-1975
9. Light RW, MacGregor MI, Luchsinger PC, Ball WC. Pleural effusions : the diagnostic separation of transudates and exudates. Ann Intern Med 1972 ; 77 : 507-513.
10. Light RW. Pleural diseases. 4th edition. Baltimore. Williams & Wilkins, 2001.
Chapter 5 : Approach to the patient, pag 87-88.
11. Hirsch A, Ruffie P, Cretein J, et al. Pleural effusion laboratory test in 300 cases. Thorax 1979 ; 34 : 106-112.
12. Ansari T, Idell S. Management of undiagnosed persistent pleural effusions. Diseases of the pleura. Clinics in Chest Medicine 1998 ; 19 : 407-417.
13. Gunnels J. Perplexing pleural effusion. Chest 1978 ; 74 : 390-393.

14. Ferrer JS, Muñoz XG, Orriols RM, et al. Evolution of idiopathic pleural effusion. A prospective, long-term follow-up study. *Chest* 1996 ; 109 : 1508-1513.
15. Houston MC. Pleural fluid pH : Diagnostic, therapeutic and prognostic value. *Am J Surgery* 1987 ; 154 : 333-337.
16. Sahn SA, Good JT. Pleural fluid pH in malignant effusions. *Ann Intern Med* 1988 ; 108 : 345-349.
17. Heffner JE, Brown LK, Barbieri C, DeLeo JM. Pleural fluid chemical analysis in parapneumonic effusions. A meta-analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 ; 151 : 1700-1708.
18. Jiménez-Castro D, Díaz G, Pérez-Rodríguez E, Prieto E, Yusen RD. Modification of pleural fluid pH by local anesthesia. *Chest* 1999 ; 116 : 399-402
19. Rodríguez-Panadero F, López Mejías J. Low glucose and pH level in malignant pleural effusions. *Am Rev Respir Dis* 1985 ; 131 : 737-741.
20. Heffner JE, McDonald J, Barbieri C, Klein J. Management of parapneumonic effusions. An analysis of physician practice patterns. *Arch Surg* 1995 ; 130 : 433-438.
21. Light RW. Diagnostic principles in pleural disease. *Eur Respir J* 1997 ; 10 : 476-81.
22. Light RW. Pleural diseases. 4rd edition. Baltimore. Williams & Wilkins, 2001. Chapter 3: Radiographic examinations, pag 21-41.
23. Ruskin JA, Gurney JW, Thorsen MK, Goodman LR. Detection of pleural effusion on supine chest radiographs. *AJR* 1987 ; 148 : 681-683.

24. Alemán C, Alegre J, Armadans LI, et al. The value of chest roentgenography in the diagnosis of pneumothorax after thoracentesis. *Am J Med* 1999 ; 107 : 340-343.
25. McLoud TC, Flower CD. Imaging the pleura : sonography, CT and MR imaging. *AJR* 1991 ; 156 : 1145-1153.
26. Yang PC, Luh KT, Chang DB, et al. Value of sonography in determining the nature of pleural effusion : analysis of 320 cases. *AJR* 1992 ; 159 : 29-33.
27. Lomas DJ, Padley SG, Flower CD. The sonographic appearances of pleural fluid. *Brit J Radiol* 1993 ; 66 : 619-624.
28. McLoud TC. CT and MR in pleural disease. *Clin Chest Med* 1998 ; 19 : 261-276.
29. Hamm H, Light RW. Parapneumonic effusion and empyema. *Eur Respir J* 1997 ; 10 : 1150-1156.
30. Wait MA, Sharma S, Hohn J, Nogare AD. A randomized trial of empyema therapy. *Chest* 1997 ; 11 : 1548-51.
31. Sahn SA. Management of complicated parapneumonic effusion. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 813-817.
32. Light RW, Porcel JM. Derrame pleural paraneumónico y empiema. En: José Manuel Porcel (ed.). *Enfermedades de la pleura*. Edicions de la Universitat de Lleida, 2002). Capítulo 4 , pag 47.
33. Ashbaugh DG. Empyema thoracis. Factors influencing morbidity and mortality. *Chest* 1991 ; 99 : 1162-65.
34. Light RW. A new classification of parapneumonic effusions and empyema. *Chest* 1995 ; 108 : 299-301.
35. Ferrer J. Pleural tuberculosis. *Eur Respir J* 1997 ; 10 : 942-947.

36. Ocaña I, Martínez-Vázquez JM, Segura RM, Fernández de Sevilla T, Capdevila JA. Adenosine deaminase in pleural fluids : test for diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Chest* 1983 ; 84 : 51-53.
37. Valdés L, San José E, Alvarez D, et al. Diagnosis of tuberculous pleuresy using the biologic parameters adenosine deaminase, lysozyme and interferon gamma. *Chest* 1993 ; 103 : 458-465
38. Epstein DM, Kline LR, Albelda SM, Miller WT. Tuberculous pleural effusions. *Chest* 1987 ; 91 : 106-109
39. Caminero Luna JA. Tuberculosis pleural. *Med Clin (Barc)* 1990 ; 94 : 384-388.
40. Valdés L, Alvarez D, San José E, Penela P, Valle JM, García-Pazos JM, et al. Tuberculous pleuresy. A study of 254 patients. *Arch Intern Med* 1998 ; 158 : 2017-2021.
41. Soler JJ, Gil Suay V, Cordero P, Perpiñá M, Martínez E, Sanchís J. Engrosamiento pleural en el derrame pleural tuberculoso. Factores asociados. *Arch Bronconeumol* 1995 ; 31 : 157-161.
42. Ruiz E, Alegre J, Alemán C, Vizcaya S, Armadans L, Segura RM, et al. Engrosamiento pleural residual en la pleuritis tuberculosa. Factores asociados. *Arch Bronconeumol* 2000 ; 36 : 506-509.
43. Sahn SA. Pleural diseases related to metastatic malignancies. *Eur Respir J* 1997 ; 10 : 1907-1913.
44. Antony VB, Loddenkemper R, Astoul P, Boutin C, Goldstraw P, Hott J et al. (American Thoracic Society). Management of malignant pleural effusions. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 ; 162 : 1987-2001.

45. Ashchi M, Golish J, Eng P, O'Donovan P. Transudative Malignant Pleural Effusions : prevalence and mechanisms. Southern Medical Journal 1998 ; 91 : 23-26.
46. Boutin C, Schlessler M, Frenay C, Astoul Ph. Malignant pleural mesothelioma. Eur Respir J 1998 ; 12 : 972-981.
47. Ruckdeschel JC. Management of malignant pleural effusions. Seminars in Oncology 1995 ; 22 : 58-63
48. Kinasewitz GT. Transudative effusions. Eur Respir J 1997 ; 10 : 714-718
49. Jurado Gámez B. Neumonía y derrame pleural. Manejo terapéutico. An Med Interna (Madrid) 1997 ; 14 : 419-424.
50. Mohhamed KA, Nasreen N, Hardwick J, Logie CS, Patterson CE, Antony VB. Bacterial induction of pleural mesothelial monolayer barrier dysfunction. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001 ; 281 : L119-L125.
51. Arai K, Lee F, Mlyajima A, et al. Cytoquines : coordinators of inmune and inflammatory responses. Annu Rev Biochem 1990 ; 59 : 783-836.
52. Dinarello Ch A. Proinflammatory cytokines. Chest 2000 ; 118 : 503-508.
53. Opal SM, DePalo VA. Anti-Inflammatory cytokines. Chest 2000 ; 117 : 1162-1172.
54. Mantovani A, Garlanda C, Introna M, Vecchi A. Regulation of endothelial cell function by pro- and anti-inflammatory cytokines. Transplantation proceedings 1998 ; 30 : 4239-4243.
55. Antony VB, Godbey SW, Kunkel SL, et al. Recruitment of inflammatory cells to the pleural space. Journal of Immunology 1993 ; 151 : 7216-7223
56. Light RW, Girard WM, Jenkinson SG, George RB. Parapneumonic effusions. Am J Med 1980 ; 69 : 985-986.

57. Malech ML, Gallis JI. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med* 1987 ; 317 : 687-694.
58. Goodman RB, Wood RG, Martin TR et al. Cytokine-stimulated human mesothelial cells produced chemotactic activity for neutrophils including interleukin-8. *J Immunol* 1992 ; 148 : 457-465.
59. Cid MC, Esparza J, Juan M. Moléculas de adhesión en las interacciones entre los leucocitos, el endotelio y la matriz extracelular (I). Estructura, distribución y función biológica. *Med Clin (Barcelona)* 1997 ; 108 : 472-477.
60. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarell L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 2000 ; 80 : 617-653.
61. Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of α_v integrins during angiogenesis : insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 1999 ; 103 : 1227-1230.
62. Hoffman JC, Krüger H, Lührs J, Hamm H. Detection of soluble adhesion molecules in pleural effusions. *Chest* 1996 ; 110 : 107-113
63. Song G, Ghossein Y, Kleinman HK, Sosne G. Angiogenic activity of human soluble intracellular adhesion molecule-1. *Cancer Res* 1999; 59: 5128-5132.
64. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989 ; 320 : 365-376
65. Alegre J, Jufresa J, Segura R, et al. Pleural-fluid myeloperoxidase in complicated and noncomplicated parapneumonic pleural effusions. *Eur Respir J* 2002 ; 19 : 320-325.
66. Alegre J, Jufresa J, Alemán C, et al. Pleural fluid myeloperoxidase as a marker of infectious pleural effusions. *Eur J Intern Med* 2001 ; 12 : 357-362.

67. Alegre J, Suriñach JM, Varela E, et al. Diagnostic accuracy of pleural fluid polymorphonuclear elastase in the differentiation between pyogenic bacterial infectious and non-infectious pleural effusions. *Respiration* 2000 ; 67 : 426-432.
68. Aleman C, Alegre J, Segura RM^a, et al. Polymorphonuclear elastase in the early diagnosis of complicated pyogenic pleural effusions. *Respiration* (in press).
69. Bittleman DB, Erger RA, Casale TB. Cytokines induce selective granulocyte chemotactic responses. *Inflamm Res* 1996 ; 45 : 89-95.
70. Grignani G, Maiolo A. Cytokines and hemostasis. *Haematologica* 2000 ; 85 : 85-90.
71. Graves DT, Jian Y. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995 ; 62 : 109-118.
72. Adams D, Lloyd A. Chemokines : leukocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet* 1997 ; 349 : 490-495.
73. Luster A. Mechanisms of disease : chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998 ; 338 : 436-445.
74. Segura RM, Alegre J, Varela E, et al. Interleukin-8 and markers of neutrophil degranulation in pleural effusions. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 ; 157 : 1565-1572.
75. Alexandrakis M, Coulocheri SA, Bouros D, Eliopoulos GD. Evaluation of ferritin, Interleukin-6, Interleukin-8 and tumor necrosis alpha in the differentiation of exudates and transudates in pleural effusions. *Anticancer Res* 1999 ; 19 : 3607-3612.

76. Broaddus VC, Hebert CA, Vitangcol RV, Hoeffel JM, Bernstein MS, Boylan AM. Interleukin-8 is a major neutrophil chemotactic factor in pleural liquid of patients with empyema. *Am Rev Respir Dis* 1992 ; 146 : 825-830.
77. Ceyhan BB, Özgün S, Çelikel T, Yalçın M, Koç M. IL-8 in pleural effusion. *Respiratory Medicine* 1996 ; 90 : 215-221.
78. Salgado A, Bóveda JL, Monasterio J, et al. Inflammatory mediators and their influence in haemostasis. *Haemostasis* 1994 ; 24 : 132-138.
79. Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor : new insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 7313-7316.
80. Gürsel G, Gökçora N, Elberg B, Samurkasoglu B, Ekim N. Tumor necrosis alpha in pleural fluids. *Tuber Lung Dis* 1995 ; 76 : 370-371.
81. Hua CC, Chang LC, Chen YC, Chang SC. Proinflammatory cytokines and fibrinolytic enzymes in tuberculous and malignant pleural effusions. *Chest* 1999 ; 116 : 1292-1296.
82. Alegre J, Segura RM, Armadans L, et al. Tumor necrosis factor alpha in tuberculous pleural effusions : relationship with markers of pleural inflammation. *Am J Crit Care Med* 1999; 159: A385.
83. Antony VB, Mohammed K. Pathophysiology of pleural space infections. *Semin Respir Infect* 1999 ; 14 : 9-17.
84. Heffner JE. Infection of pleural space. *Clin Chest Med* 1999 ; 20 : 607-622.
85. Idell S, Zwieb C, Kumar A, Koenig KB, Johnson AR. Pathways of fibrin turnover of human pleural mesothelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992 ; 7 : 414-426.
86. Philip-Joët F, Alessi M-C, Philip-Joët C, et al. Fibrinolytic and inflammatory processes in pleural effusions. *Eur Respir J* 1995 ; 8 : 1352-1356.

87. Idell S, Girard W, Koenig KB, McLarty J, Fair DS. Abnormalities of pathways of fibrin turnover in the human pleural space. *Am Rev Respir Dis* 1991 ; 144 : 187-194.
88. Alemán C. Influencia de los mediadores de inflamación sobre la degradación de la fibrina en los derrames pleurales infecciosos. Tesis Doctoral, Barcelona 2000.
89. Özdemir O, Emri S, Karakoca Y, et al. Fibrinolytic system in plasma and pleural fluid in malignant pleural mesothelioma. *Thromb Res* 1996 ; 84 : 121-128.
90. Agrenius V, Chmielewska J, Widström O, Blombäck M. Pleural fibrinolytic activity is decreased in inflammation as demonstrated in quinacrine pleurodesis treatment of malignant pleural effusion. *Am Rev Respir Dis* 1989 ; 140 : 1381-1385.
91. Agrenius V, Chmielewska J, Widström O, Blombäck M. Increased coagulation activity of the pleura after tube drainage and quinacrine instillation in malignant pleural effusion. *Eur Respir J* 1991 ; 4 : 1135-1139.
92. Rodríguez-Panadero F, Segado A, Martín-Juan J, Ayerbe R, Torres-García I, Castillo J. Failure of talc pleurodesis is associated with increased pleural fibrinolysis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 ; 151 : 785-90.
93. Massignon D, Lepape A, Bienvenu J, Barbier Y, Boileau C, Coeur P. Coagulation/Fibrinolytic balance in septic shock related to cytokines and clinical state. *Haemostasis* 1994 ; 24 : 36-48.
94. Salgado A, Bóveda JL, Monasterio J, et al. Inflammatory mediators and their influence on haemostasis. *Haemostasis* 1994 ; 24 : 132-138.

95. Esmon CT, Fukudome K, Mather T, et al. Inflammation, sepsis and coagulation. *Haematologica* 1999 ; 84 : 254-259.
96. Raghov R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *FASEB* 1994 ; 8 : 823-831.
97. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987 ; 235 : 442-447.
98. Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis : a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 1999 ; 103 : 1237-1241.
99. Marshall BC, Santana A, Xu Q-P, et al. Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in mesothelial cells. *J Clin Invest* 1993 ; 91 : 1792-1799.
100. Kugler A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Anticancer Research* 1999 ; 19 : 1589-1592.
101. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB* 1991 ; 5 : 2145-2154.
102. Galis Z.S. Metalloproteases in remodeling of vascular extracellular matrix. *Fibrinolysis and proteolysis* 1999 ; 13 : 54-63.
103. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases : Biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000 ; 18 : 1135-1149.
104. Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1995 ; 7 : 728-735.
105. Shapiro SD, Senior RM. Matrix metalloproteinases. Matrix degradation and more. *Am J Respir Cell Moll Biol* 1999 ; 20 : 1100-1102.

106. Willenbrock F, Murphy G. Structure-Function relationships in the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Am J Respir Crit Care Med* 1994 ; 150 : S165-170.
107. Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines : an absolute requirement for transcription factor NF- κ B. *FEBS Letters* 1998 ; 435 : 29-34
108. Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix : biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 1998 ; 10 : 602-608.
109. Gómez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases : structure, regulation and biological functions.
110. Kinoh H, Sato H, Tsunozuka Y, et al. MT-MMP, the cell surface activator of pro-MMP-2 (pro-gelatinase A), is expressed with its substrate in mouse tissue during embryogenesis. *J Cell Science* 1996 ; 109 : 953-959.
111. Fernández-Patrón C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* 1999 ; 85 : 906-911
112. Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE. Extracellular matrix 6 : role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J* 1993 ; 7 : 1434-1441.
113. Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, et al. Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1996 ; 149 : 1241-1256.
114. Murphy G, Docherty AJP. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7: 120-125.

115. Hoheisel G, Sack U, Hui DS, et al. Occurrence of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in tuberculous pleuritis. *Tuberculosis (Edinb)* 2001 ; 81 : 203-209.
116. Hurewitz AN, Wu CI, Mancuso P, Zucker S. Tetracycline and doxycycline inhibit pleural fluid metalloproteinases. *Chest* 1993 ; 103 : 1113-1117.
117. Hurewitz AN, Zucker S, Mancuso P, et al. Human pleural effusions are rich in matrix metalloproteinases. *Chest* 1992 ; 102 : 1808-14.
118. Eickelberg O, Sommerfeld CO, Wyser C, et al. MMP and TIMP expression pattern in pleural effusions of different origins. *Am J Respir Crit Care Med* 1997 ; 156 : 1987-1992.
119. Vaday GG, Franitza S, Schor H, et al. Combinatorial signals by inflammatory cytokines and chemokines mediate leukocyte interactions with extracellular matrix. *J Leuk Biol* 2001 ; 69 : 885-892.
120. Pugin J, Widmer MC, Kossodo S, Liang CM, Preas HL, Suffredini AF. Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999 ; 20 : 458-464.
121. Lijnen HR, Collen D. Matrix metalloproteinase system deficiencies and matrix degradation. *Thromb Haemost* 1999 ; 82 : 837-845.
122. Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 1994 ; 7 : 2062-2072.
123. Iglesias D. Asociación de las metaloproteinasas y sus inhibidores tisulares con el sistema de la fibrinólisis y los marcadores de activación neutrofílica en los derrames pleurales paraneumónicos. Tesis doctoral. Barcelona 2002.

124. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 10931-10934.
125. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995 ; 333 : 1757-1763.
126. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996 ; 86 : 353-364.
127. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997 ; 386 : 671-674.
128. Bussolino F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *TIBS* 1997 ; 22 : 251-256.
129. Stromblad S, Becker JC, Yebra M, Brooks PC, Cheresh DA. Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin $\alpha_v\beta_3$ during angiogenesis. *J Clin Invest* 1996 ; 98 : 426-433.
130. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresh DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct α_v integrins. *Science* 1995 ; 270 : 1500-1502.
131. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors : the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 1998 ; 50 : 197-263.
132. Koch AE. Angiogenesis. Implications for Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 1998 ; 41 : 951-962.
133. Nakagawa K, Zhang Y, Tsuji H, et al. The angiogenic effect of tissue factor on tumors and wounds. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1998 ; 24 : 207-210.
134. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H et al. Vascular permeability factor : a tumor derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte

procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990;172:1535-1545.

135. Carmeliet P. Clotting factors build blood vessels. *Science* 2001 ; 293 : 1602-1604.

136. Amirkhosravi A, Meyer T, Warnes G, et al. Pentoxifyline inhibits hypoxia-induced upregulation of tumor cell tissue factor and endothelial growth factor. *Thromb Haemost* 1998 ; 80 : 598-602.

137. Bottles KD, Laszik Z, Morrissey JH, Kinasewitz GT. Tissue factor expression in mesothelial cells : induction both in vivo and in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997 ; 17 : 164-172.

138. Ollivier V, Bentolila S, Chabbat J, Hakim J, De Prost D. Tissue-factor-dependent vascular endothelial growth factor production by human fibroblasts in response to activated factor VII. *Blood* 1998 ; 91 : 2698-2703.

139. Zhang YM, Deng YH, Luther T, et al. Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest* 1994 ; 94 : 1320.

140. Blum S, Issbrücker K, Willuweit A, et al. An inhibitory role of the phosphatidylinositol 3-kinase-signaling pathway in vascular endothelial growth factor-induced tissue factor expression. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 33428-33431.

141. Mechtcheriakova D, Wlachos A, Holzmüller H, Binder BR, Hofer E. Vascular endothelial cell growth factor induced tissue factor expression in endothelial cells is mediated by EGR-1. *Blood* 1999 ; 93 : 3811-3823.

142. Shin-ichi S, Onodera H, Kaido T, et al. Tissue factor expression in human colorectal carcinoma. Correlation with hepatic metastasis and impact on prognosis. *Cancer* 2000 ; 88 : 295-301.

143. Bromberg M, Sundaram R, Homer RJ, Garen A, Konigsberg WH. Role of tissue factor in metastasis : functions of the cytoplasmic and extracellular domains of the molecule. *Thromb Haemost* 1999 ; 82 : 88-92.
144. Koomägi R, Volm M. Tissue-factor expression in human non-small-cell lung carcinoma measured by immunohistochemistry : correlation between tissue factor and angiogenesis. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1998 ; 79 : 19-22.
145. Konigsberg W, Kirchhofer D, Riederer MA, Nemerson Y. The TF : VIIa complex : clinical significance, structure-function, relationships and its role in signaling metastasis. *Thromb Haemost* 2001 : 86 : 757-771.
146. Nakasaki T, Wada H, Shigemori Ch, et al. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol* 2002 ; 69 : 247-254.
147. Zachary I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001 ; 280 :C1375-1386.
148. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999 ; 13 : 9-22
149. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001 ; 114 : 853-865.
150. Yanagawa H, Takeuchi E, Suzuki Y, Ohmoto Y, Bando H, Sone S. Vascular endothelial growth factor in malignant pleural effusion associated with lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 1999 ; 48 : 396-400.
151. Taichman NS, Young S, Cruchley AT, Taylor P, Paleolog E. Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. *J Leukoc Biol* 1997 ; 62 : 397-400.

152. Gaudry M, Brégerie O, Andrieu V, El Benna J, Pocardalo M-A, Hakim J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood* 1997 ; 90 : 4153-4161.
153. Cvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hipermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995 ; 146 : 1029-1039.
154. Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 603-606.
155. Grove CS, Gary Lee Y.C. Vascular endothelial growth factor : the key mediator in pleural effusion formation. *Curr Opin Pulm Med* 2002 ; 8 : 294-301.
156. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt-4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996 ; 15 : 290-298.
157. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999 ; 77 : 527-543.
158. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, et al. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 2000 ; 342 : 626-633.
159. Perkett EA, Klekamp JG. Vascular endothelial growth factor expression is decreased in rat lung following exposure to 24 or 48 h of hyperoxia : implications for endothelial cell survival. *Chest* 1998 ; 114 (suppl) : 52S-53S.
160. Cheng DS, Rodríguez RM, Perkett EA, et al. Vascular endothelial growth factor in pleural fluid. *Chest* 1999 ; 116 : 760-765.

161. Thickett DR, Armstrong L, Millar AB. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammatory and malignant pleural effusions. *Thorax* 1999 ; 54 : 707-710.
162. Clauss M, SunderKötter C, Sveinbjörnsson B, et al. A permissive role of tumor necrosis factor in vascular endothelial growth factor-induced vascular permeability. *Blood* 2001 ; 97 : 1321-1329.
163. Ristimäki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem* 1998 273 ; 8413-8418.
164. McCourt M, Wang JH, Sookhai S, Redmond HP. Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. *Arch Surg* 1999 ; 134 : 1325-1332.
165. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor- α . *Nature* 1987 ; 329 : 630-632.
166. Wahl SM. Transforming growth factor- β (TGF- β) in the Resolution and repair of inflammation. In *Inflammation : basic principles and clinical correlates*. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 1999. Pag 883-892.
167. Wang B, Wiong Q, Shi Q, Tan D, Le X, Xie K. Genetic disruption of host nitric oxide synthase II gene impairs melanoma-induced angiogenesis and suppresses pleural effusion. *Int J Cancer* 2001 ; 91 : 607-6011
168. Matsumoto K, Ohi H, Kanmatsuse K. Interleukin 10 and interleukin 13 synergize to inhibit vascular permeability factor release by peripheral blood mononuclear cells from patients with lipoid nephrosis. *Nephron* 1997 ; 77 : 212-218.

169. Rifkin DB, Moscatelli D, Bizik J, et al. Growth factor control of extracellular proteolysis. *Cell Differentiation and Development* 1990 ; 32 : 313-318.
170. Nissen NN, Polverini PJ, Gamelli RL, DiPietro LA. Basic fibroblast growth factor mediates angiogenic activity in early surgical wounds. *Surgery* 1996 ; 119 : 457-465
171. Burchill SA, Westwood G. Mechanism of basic fibroblastic growth factor-induced cell death. *Apoptosis* 2002 ; 7 : 5-12.
172. Iruela-Arispe ML, Dvorak HF. Angiogenesis : a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb and Haemost* 1997 ; 78 : 672-677.
173. Arenberg DA, Strieter RM. Angiogenesis. In *Inflammation : basic principles and clinical correlates*. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 1999. Pag 851-864.
174. Pepper MS, Belin D, Montesano R, Orli L, Vassalli JD. Transforming growth beta-1 modulates basic-fibroblastic growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 1990; 111: 743-755.
175. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin : a novel angiogenesis inhibitor that mediates the supression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994 ; 79 : 315-328.
176. Sten-Linder M, Linder C, Strander H, et al. Angiostatin fragments in urine from patients with malignant disease. *Anticancer Res* 1999 ; 19 : 3409-3414.
177. Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, et al. Matrix metalloproteinases generate angiostatin : effects on neovascularization. *J Immunol* 1998 ; 161 : 6845-6852.

178. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin : an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997 ; 88 : 277-285.
179. Iruela-Arispe ML, Porter P, Bornstein P, Sage EH. Thrombospondin-1, an inhibitor of angiogenesis, is regulated by progesterone in the human endometrium. *J Clin Invest* 1996 ; 97 : 403-412.
180. DiPietro LA, Nebgen DR, Polverini PJ. Downregulation of endothelial cell thrombospondin 1 enhances in vitro angiogenesis. *J Vasc Res* 1994 ; 31 : 178-185.
181. Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ, Bouck N. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin 1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol* 1993 ; 122 : 497-511.
182. Adams JC. Molecules in focus. Thrombospondin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 1997 ; 29 : 861-865.
183. Albo D, Berger DH, Wang TN, et al. Thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta1 promote breast tumor cell invasion through up-regulation of the plasminogen/plasmin system. *Surgery* 1997 ; 122 : 493-500.
184. Frazier WA. Thrombospondins. *Curr Opin Cell Biol* 1991 ; 3 : 792-9.
185. Murphy-Ullrich JE, Höök M. Thrombospondin modulates focal adhesions in endothelial cells. *J Cell Biol* 1989 ; 109 : 1309-1319.
186. Rodríguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, Hynes RO, Lawler J, Iruela-Arispe ML. Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *PNAS* 2001 ; 98 : 12485-12490.

187. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994 ; 265 : 1582-1584.
188. Lee WS, Jain MK, Arkonac BM, et al. Thy-1, a novel marker for angiogenesis upregulated by inflammatory cytokines. *Circ Res* 1998 ; 82 : 845-851.
189. Van Hinsbergh VWM, Koolwijk P, Hanemaaijer R. Role of fibrin and plasminogen activators in repair-associated angiogenesis : in vitro studies with human endothelial cells. *Regulation of Angiogenesis 1997*, ed by I.D. Goldberg & E.M.Rosen, Switzerland. Pag 391-411.
190. Mazziere R, Masiero L, Zanetta L, et al. Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system : a regulatory mechanism with cell bound reactants. *EMBO J* 1997 ; 16 : 2319-2332.
191. Matsuyama W, Hashiguchi T, Mizoguchi A, et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor dependent on the stage progression of lung cancer. *Chest* 2000 ; 118 : 948-951.
192. Scola MP, Imagawa T, Boivin GP, et al. Expression of angiogenic factors in Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2001 ; 44 : 794-801.
193. The role of angiogenesis in rheumatoid arthritis : recent developments. *Ann Rheum Dis* 2000 ; 59 (suppl) : i65-i71.
194. Rizk B, Aboulghar M, Smitz J, Ron-El R. The role of vascular endothelial growth factor and interleukins in the pathogenesis of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Human Reproduction Update* 1997 ; 3 : 255-266.
195. Ludwig M, Bauer O, Lopens A, Jelkmann W, Diedrich K. Serum concentration of vascular endothelial growth factor cannot predict the course of

severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Human Reproduction* 1998 ; 13 : 30-32.

196. Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J* 1997 ; 11 : 457-465.

197. Hebbbar M, Peyrat J-P, Hornez L, Hatron P-Y, Hachulla E, Devulder B. Increased concentrations of the circulating angiogenesis inhibitor endostatin in patients with Systemic Sclerosis. *Arthritis & Rheumatism* 2000 ; 43 : 889-893.

198. Iguchi A, Kobayashi R, Yoshida M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the cytokines causative and predictive of hepatic veno-occlusive disease (VOD) in stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2001 ; 27 : 1173-1180.

199. Ping Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001 ; 19 : 1207-1225.

200. Berse B, Brown LF, Van De Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (Vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages and tumors. *Molecular Biology of the Cell* 1992 ; 3 : 211-220.

201. McLeskey SW, Tobias CA, Vezza PR, Filie AC, Kern FG, Hanfelt J. Tumor growth of FGF or VEGF transfected MCF-7 breast carcinoma cells correlates with density of specific microvessels independent of the transfected angiogenic factor. *Am J Pathol* 1998 ; 153 : 1993-2006.

202. Baillie CT, Winslet MC, Bradley NJ. Tumour vasculature : a potential therapeutic target. *Br J Cancer* 1995 ; 72 : 257-267.

203. Klein M, Picard E, Vignaud JM, et al. Vascular endothelial growth factor gene and protein : strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma. *J Endocrinol* 1999 ; 161 : 41-49.
204. Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, et al. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1999 ; 5 : 1369-1379.
205. Ishimoto O, Saijo Y, Narumi K. High level of vascular endothelial growth factor in hemorrhagic pleural effusion of cancer. *Oncology* 2002 ; 63 : 70-75.
206. Strizzi L, Vianale G, Catalano A, Muraro R, Mutti L, Procopio A. Basic fibroblast growth factor in mesothelioma pleural effusions correlation with patient survival and angiogenesis. *Int J Oncol* 2001 ; 18 : 1093-1098.
207. König JE, Tolnay E, Wiethöge T, Müller KM. Co-expression of vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1 in malignant pleural mesothelioma. *Respiration* 2000; 67:36-40.
- 208.- Strizzi L, Catalano A, Vianale G, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor in human malignant mesothelioma. *J Pathol* 2001; 193: 468-75.
209. Yeo KT, Wang HH, Nagy JA, et al. Vascular permeability factor (Vascular endothelial growth factor) in Guinea Pig and Human Tumor and Inflammatory effusions. *Cancer Res* 1993 ; 53 : 2912-2918.
210. Kraft A, Weindel K, Ochs A, et al. Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and nonmalignant disease. *Cancer* 1999 ; 85 : 178-87.

211. Zebrowski BK, Yano S, Liu W. Vascular endothelial growth factor levels and induction of permeability in malignant pleural effusions. *Clin Cancer Res* 1999 ; 5 : 3364-3368.
212. Aoki Y, Tosato G. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in the pathogenesis of primary effusion lymphomas. *Leukemia and Lymphoma* 2001 ; 41 : 229-237.
213. Momi A, Matsuyama W, Inoue K, et al. Vascular endothelial growth factor and proinflammatory cytokines in pleural effusions. *Respir Med* 2002; 96:817-822.
214. Cheng D, Gary-Lee YC, Rogers JT, et al. Vascular endothelial growth factor level correlates with transforming growth factor- β isoform levels in pleural effusions. *Chest* 2000 ; 118 : 1747-1753.
215. Gary-Lee YC, Melkerneker D, Thompson PJ, Light RW, Lane KB. Transforming growth factor β induces vascular endothelial growth factor elaboration from pleural mesothelial cells in vivo and in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 ; 165 : 88-94.
216. Gary-Lee YC, Lane KB. The many faces of transforming growth factor- β in pleural diseases. *Curr Opin Pulm Med* 2001 ; 7 : 173-179.
217. Verheul HM, Hoekman K, Jorna AS, Smit EF, Pinedo HM. Targeting VEGF blockade ascites and pleural effusion formation. *Oncologist* 2000; 5 (suppl 1): 45-50.
218. Wood JM. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) as an approach for cancer therapy. *Medicina (Buenos Aires)* 2000; 60 (suppl 2): 41-47.
219. SPSS for Windows. Release 6.0. Chicago, IL : SPSS Inc. 1993.

220. Light RW, MacGregor MI, Luchsinger PC, Ball WC. Pleural effusions : diagnostic separation of transudates and exudates. *An Intern Med* 1972 ; 77 : 507-513.
221. Light RW. A new classification of parapneumonic effusions and empyema. *Chest* 1995 ; 108 : 299-301.
222. Grunze H. The comparative diagnostic accuracy, efficiency and specificity of cytologic techniques used in the diagnosis of malignant neoplasm in serous effusions of the pleural and pericardial cavities. *Acta Cytol* 1964 ; 8 : 150-164.
223. Jarvi OH, Kunnas RJ, Laitio MT, Tyrkko JES. The accuracy and significance of cytologic cancer diagnosis of pleural effusions. *Cacta Cytol* 1972 ; 16 : 152-157.
224. Sahn SA. Malignant pleural effusion. *Semin Respir Med* 1987 ; 9 : 43-53.
225. Menzies R, Chanvommeau M. Thoracoscopy for the diagnosis of pleural disease. *Ann Intern Med* 1991 ; 114 : 271-275.
226. Robinson GR, Gleeson K. Diagnostic flexible fiberoptic pleuroscopy in suspected malignant pleural effusion. *Chest* 1995 ; 107 : 424-429.
227. Roth B. Examining the pleura. *Chest* 1995 ; 107 :299-300
228. Boutin C, Astout P, Seitz B. The role of thoracoscopy in the evaluation and management of pleural effusions. *Lung* 1990 ; (suppl) : 1113-21.
229. Porcel JM, Vives M. Classic, abbreviated, and modified Light's criteria. The end of the story ? *Chest* 1999 ; 116 : 1833-1834.
230. Ferrer A, Osset J, Alegre J, et al. Prospective clinical and microbiological study of pleural effusions. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 237-241.
231. Ishibashi H, Nakagawa K, Onimaru M, et al. Sp1 decoy transfected to carcinoma cells suppresses the expression of vascular endothelial growth

factor, transforming growth factor β 1, and tissue factor and also cell growth and invasion activities. *Cancer Res* 2000 ; 60 : 6531-6536.

232. Milligan SA, Owens MW, Grisham MB. Augmentation of cytokine-induced nitric-oxide synthesis by hydrogen peroxide. *Am J Physiol* 1996 ; 271 : 114-120.

233. D'Arcangelo D, Facchiano F, Barlucchi LM, et al. Acidosis inhibits endothelial cell apoptosis and function and induces basic fibroblastic growth factor and vascular endothelial growth factor expression. *Circ Res* 2000 ; 86 : 312-318.

234. Sobradillo V, Zalacaín R, Galdiz JB, Amilibia J, Capelástegui A. Derrames paraneumónicos : evolución a 12 meses. *Med Clin (Barcelona)* 1984 ; 83 : 317-320.

235. Martínez MA, Cordero PJ, Cases E, et al. Factores predictivos del engrosamiento pleural residual en el derrame pleural metaneumónico. *Arch Bronconeumol* 1999 ; 35 : 108-112.

236. Barbas CS, Cukier A, de Varvalho CR, Barbas Filho JV, Light RW. The relationship between pleural fluids findings and the development of pleural thickening in patients with pleural tuberculosis. *Chest* 1991 ; 100 : 1264-1267.