

BERNARDO HENRIQUE FERRAZ MARANHÃO

**ACURÁCIA DA ENZIMA ADENOSINA DESAMINASE COMO
BIOMARCADOR PARA DIAGNOSTICAR EXSUDATOS E
TRANSUDATOS PLEURAIS.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

SÃO PAULO

2025

BERNARDO HENRIQUE FERRAZ MARANHÃO

**ACURÁCIA DA ENZIMA ADENOSINA DESAMINASE COMO
BIOMARCADOR PARA DIAGNOSTICAR EXSUDATOS E
TRANSUDATOS PLEURAIS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Santa
Casa de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Roberto Stirbulov

Co-orientador: Prof. Dr. Cyro Teixeira da Silva
Junior

SÃO PAULO

2025

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca Central da
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

Maranhão, Bernardo Henrique Ferraz

Acurácia da enzima adenosina desaminase como biomarcador para diagnosticar exsudatos e transudatos pleurais./ Bernardo Henrique Ferraz Maranhão. São Paulo, 2025.

Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Roberto Stirbulov

Coorientador: Cyro Teixeira da Silva Junior

1. Derrame pleural 2. Adenosina desaminase 3. Exsudatos e transudatos 4. Diagnóstico 5. Biomarcadores

BC-FCMSCSP/59-25

DEDICATÓRIAS

*Ao meu pai **Ronald (in memoriam)** e minha mãe **Regina**, estrelas guias, de onde partiram os meus primeiros passos nesta caminhada pela vida. Verdadeiros alicerces, responsáveis legítimos pelos fundamentos de honestidade, trabalho e retidão que deles herdei. A vocês, minha profunda gratidão pelo ser humano e profissional que me tornei graças ao caminho que me indicaram desde minhas respirações iniciais na jornada da vida.*

*Ao meu filho, **Rodrigo**, um diamante que Deus me concedeu, motivo de orgulho, por quem e para quem tudo na minha vida tem sentido. Minha versão aprimorada, modelo de caráter e amor que emana. Palavras que dimensionem sua importância não conseguem expressar o tamanho do amor e felicidade que ele é capaz de em mim despertar.*

*À minha amada esposa, **Simone**, acima de tudo parceira, companheira e amiga, de quem sempre recebi amor, apoio e estímulo incondicionais. Me impulsiona de forma decisiva e serena em cada etapa ou projetos que me proponho a seguir. Dela partem palavras de força, o “vai em frente” que precisamos para fazer de um ideal uma realização. Além de tudo, uma “pleuróloga”, autora de livros sobre o assunto que me auxiliaram a melhor entender os enigmas da cavidade pleural.*

*À minha família, especialmente **Renata** (irmã), **Clara e Joana** (sobrinhas), sangue do meu sangue, célula mater, minha essência, minha tudo!*

*Ao Professor **Dr. Antonio Monteiro da Silva Chibante**, Professor Associado da Universidade Federal do Estado do Rio De Janeiro (UNIRIO), muito mais que um colega de especialidade, certamente uma inestimável fonte de sabedoria, alguém que acompanho e me inspira desde o primeiro dia de aprendizado da Pneumologia. Seu profundo conhecimento em Pleura desperta interesses e auxilia diversas gerações de*

especialistas, posto que é um dos maiores renomes sobre o tema na medicina contemporânea, autor de livros e trabalhos de elevadíssimos valores científicos.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e à Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pela oportunidade de realização deste Doutorado.

À Fundação Arnaldo Vieira de Carvalho, pela bolsa concedida durante a realização desta tese.

Ao meu orientador Professor Dr. Roberto Stirbulov, Professor Titular de Pneumologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, quem há muito me inspira como líder. Professor com “P” maiúsculo, exemplo de ser humano que me encaminhou na vida associativa e prima pela capacidade de transmitir seu inesgotável conhecimento com habilidade de poucos. E neste momento, fundamental uma vez mais na orientação desta tese, contribuindo com seu saber, constante estímulo e confiando em minha proposta científica desde o primeiro momento. Enfim, um profissional e amigo destes para se “guardar do lado direito do peito”.

Ao meu co-orientador Professor Dr. Cyro Teixeira da Silva Junior, Professor Titular de Pneumologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense, pela proximidade ao longo da elaboração desta tese, cálculos, orientação da parte estatística do trabalho e pelas redações em inglês dos manuscritos enviados e aceitos para publicação. Além das contribuições inestimáveis acima referidas, uma verdadeira referência no estudo das doenças pleurais no Brasil e no mundo, o qual me deu a honra de fazer parte do grupo de Pleura por ele liderado, despertando o interesse por esta área da Pneumologia no início da minha carreira docente, desde o Mestrado e agora, no Doutorado.

Aos membros da Banca que participaram da defesa desta tese. Uma honra contar com suas avaliações.

Aos pacientes, motivos maiores de nossas buscas pela excelência científica e humana.

A DEUS, luz maior a iluminar nosso caminho, e que com sua bondade nos fornece os insumos necessários para seguirmos adiante ao longo da existência.

CITAÇÃO

“O segredo do sucesso é a constância do propósito”

Benjamin Disraeli

1804-1881

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADA	Enzima adenosina desaminase
ADA 1	Isoenzima 1 da ADA
ADA 2	Isoenzima 2 da ADA
ADA-P	ADA total no Líquido pleural
ANOVA	Análise de variância
AUC	Área sob a curva ROC
BTS	British Thoracic Society
COAs	C linical Outcome Assessments
CUI	índice de utilidade clínica
Curva ROC	Receiver Operating Characteristic
DHL	Desidrogenase láctica
DOR	Razão de chances diagnóstica
DPCI	Derrames pleurais de causa indeterminada
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ETUS	Ultrassonografia transtorácica extracardíaca
FPR	Taxa de falsos positivos ou “False Positive Rate”
IC 95%	Intervalos de confiança a 95% de probabilidade
IIQ	Intervalo interquartil
<i>IQR</i>	<i>Interquartile range</i>
LP	Líquido pleural
OMS	Organização Mundial de Saúde
RL	Regressão logística
RLS	Regressão logística simples
SDP	Síndrome do derrame pleural
TB	Tuberculose
TPR	Taxa de verdadeiros positivos ou “Test Positivity Rate”
VATS	Cirurgia Torácica Video-Assistida
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo
RVP	Razão de verossimilhança positiva
RVN	Razão de verossimilhança negativa

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	01
1.1 – Conceito de derrame pleural.....	02
1.2 – Anatomia, fisiologia e patologia pleural.....	03
1.3 – Conceitos e exemplos de transudatos e exsudatos pleurais.....	04
1.4 – Critérios de Light e Maranhão e Silva Junior para classificar exsudatos e transudatos pleurais.....	06
1.5 – Adenosina desaminase.....	08
2- OBJETIVOS.....	11
2.1 – Geral.....	12
2.2 – Específicos.....	12
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	13
3.1 – Diretrizes, Delineamento, População do Estudo, Critérios de Seleção e Tamanho da Amostra.....	14
3.2 – Critérios diagnósticos de inclusão de pacientes e laboratoriais de amostras de líquido pleural.....	15
3.3 – Critérios diagnósticos de exclusão dos pacientes e laboratoriais de amostras de líquido pleural.....	16
3.4 – Análise bioquímica da ADA total no líquido pleural (ADA-P).....	16
3.5 – Planejamento e abordagem estatística.....	18
3.5.1 – Estatística descritiva e inferencial.....	18
3.5.2 – Tamanho da amostra e técnica de amostragem.....	19
3.5.3 – Discriminação do valor de referência do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais a partir da curva ROC..	20
3.5.4 – Parâmetros diagnósticos ou classificação de “performance” do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais a partir do valor de referência selecionado na curva ROC..	22
3.5.5 – Validação dos parâmetros diagnósticos do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais na ausência de um modelo de predição clínica com análise de regressão.....	23

4- RESULTADOS.....	25
4.1 – Tamanho da amostra.....	26
4.2 – Tamanho do efeito estatístico da amostra.....	26
4.3 – Prevalência, características demográficas e laboratoriais.....	26
4.4 – Resultados da determinação, discriminação e critério para seleção do valor de referência do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos e pleurais a partir da curva ROC e AUC.....	28
4.5 – Parâmetros diagnósticos e tamanho do efeito estatístico para desempenho técnico do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais.....	30
4.6 – Validação dos parâmetros diagnósticos do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais na ausência de análise de regressão: validação interna, calibração por “bootstrapping”, curva de calibração e índice de utilidade clínica.....	31
5- DISCUSSÃO.....	33
5.1 – Contextualização do biomarcador ADA-P.....	34
5.2 – Controle de vieses em estudo retrospectivo.....	35
5.3 – Justificativa do número da amostra (N) e tamanho do efeito estatístico.....	36
5.4 – Prevalência de tuberculose pleural e outras causas de SDP no estudo.....	39
5.5 – Características demográficas da população estudada.....	41
5.6 – Resultados laboratoriais da ADA-P.....	41
5.7 – Discussão sobre o poder de discriminação do valor de referência do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais utilizando a curva ROC e AUC.....	42
5.8 – Discussão sobre os parâmetros diagnósticos do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais.....	47
5.9 – Discussão sobre diferenças de interpretação estatística sobre o “odds ratio” calculado a partir da curva ROC (“diagnostic odds ratio” ou DOR) e sobre o “odds ratio” calculado e derivado de um modelo de predição clínica com cálculos de regressão.....	53

5.10 – Discussão sobre a validação do desempenho ou “performance” dos parâmetros diagnósticos do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais na ausência de análise de regressão: validação interna, calibração por “bootstrapping”, curva de calibração e índice de utilidade clínica.....	55
5.10.1 – Discussão sobre o método clássico de “bootstrapping” para validação interna e calibração do biomarcador ADA-P na ausência de um modelo de regressão.....	58
5.10.2 – Discussão sobre a curva de calibração para validação interna da ADA-P para diagnosticar exsudatos pleurais na ausência de um modelo de regressão.....	59
5.10.3 – Discussão sobre o índice de utilidade clínica da ADA-P para classificar exsudatos pleurais.....	61
6- CONCLUSÕES.....	63
7- REFERÊNCIAS.....	66
RESUMO.....	77
ABSTRACT.....	80
ANEXOS.....	83
Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa.....	84
Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	92
Anexo 3 – Artigo Original Publicado 1.....	94
Anexo 4 – Artigo Original Publicado 2.....	101
Anexo 5 – Editorial referente ao Artigo Original Publicado 2.....	111
Anexo 6 – Artigo Original 3 (comprovante de aceite).....	116

Estima-se que nos Estados Unidos mais de 1,5 milhão de casos de derrame pleural sejam diagnosticados por ano (Feller-Kopman e Light, 2018). A maioria dos casos resultantes de insuficiência cardíaca congestiva, pneumonia e câncer. O pneumotórax espontâneo nessa publicação afetava aproximadamente 20.000 pacientes, a incidência de pneumotórax iatrogênico foi semelhante. Nos últimos anos, avanços substanciais foram feitos em nossa compreensão da biologia pleural e fisiopatologia relacionadas ao líquido pleural e células mesoteliais, bem como no tratamento de derrames parapneumônicos, empiema e derrames pleurais malignos e transudativos. Independentemente da causa, os objetivos do atendimento ao paciente são o diagnóstico rápido e eficaz, com intervenções minimamente invasivas que evitem a necessidade de múltiplos procedimentos, minimizem os dias de internação e maximizem a qualidade de vida (Feller-Kopman e Light, 2018).

1.1. Conceito de derrame pleural

O derrame pleural não é uma doença, mas uma complicação causada por várias doenças. Ou seja, trata-se de uma síndrome. A síndrome do derrame pleural (SDP) ainda é cercada de desafios em sua etiologia. Isto se deve pela escassez de biomarcadores diagnósticos que indiquem, com elevadas sensibilidade e especificidade a doença causal (Roberts et al., 2023).

Mesmo adotando um apurado algoritmo de investigação, podemos nos deparar com os derrames pleurais de causa indeterminada (DPCI), os quais ocorrem em cerca de 20% dos casos. Para se assumir como sendo DPCI todo roteiro de procedimentos e exames deve ter sido percorrido, ou seja, revisão clínica, imagens do tórax, análise do líquido pleural e soro. Mandatoriamente, os pacientes devem ser seguidos ao longo

do tempo a fim de terem seus parâmetros clínicos, laboratoriais reavaliados na expectativa que a causa seja esclarecida sequencialmente (Hooper et al., 2010; Villena et al., 2014). Cabe lembrar que o caminho para o diagnóstico causal de um paciente com SDP deve ser multidisciplinar.

1.2. Anatomia, fisiologia e patologia pleural

Do ponto de vista anatômico, a pleura parietal recobre a parede torácica e a visceral envolve os pulmões, formando o espaço pleural que embora seja considerado virtual, as consequências do seu comprometimento são reais (Charalampidis et al., 2015).

Fisiologicamente, a cavidade pleural tem pressão subatmosférica ou “negativa” variando de -3 a -5 cm de H₂O em virtude do balanço pressórico entre a força de recolhimento elástico dos pulmões em contraposição àquela exercida em sentido oposto pela parede torácica. O gradiente pressórico se mantém em níveis de negatividade e a função de evitar micro atelectasias pulmonares quando os pulmões se encontram em suas capacidades residuais funcionais (Ferreiro et al., 2024). No entanto, os elefantes não possuem um espaço pleural. Em vez disso, possuem camadas de tecido conjuntivo denso e frouxo entre o pulmão e a parede torácica. Curiosamente, postula-se que, se os elefantes tivessem um espaço pleural, o gradiente de pressão entre a atmosfera e seu tórax submerso (aproximadamente 150 mm Hg) em um rio, romperia os pequenos capilares pleurais e criaria grandes derrames pleurais transudativos (West, 2002).

Do ponto de vista patológico, a pleura pode ser envolvida direta ou indiretamente por doenças locais e sistêmicas. O resultado comum, tanto numa

situação como na outra é o surgimento de líquido pleural entre os folhetos parietal e visceral, determinando a SDP. Portanto, ao se deparar com tal condição, torna-se fundamental a investigação do fator desencadeante, uma vez que a cavidade pleural é uma verdadeira “janela” para o diagnóstico de diversas enfermidades (Ferreiro et al., 2024).

1.3. Conceitos e exemplos de transudatos e exsudatos pleurais

Na primeira etapa para o diagnóstico diferencial é necessária a diferenciação se o líquido pleural é um transudato ou exsudato. Caso a primeira possibilidade seja definida, estaremos diante de uma condição na qual a pleura não apresenta doenças diretamente, e sim o acúmulo de líquido o fará por fatores sistêmicos. Já o exsudato aponta para existência de algum processo inflamatório e/ou neoplásico envolvendo diretamente a pleura, ou seja, há doença local a ser identificada (Feller-Kopman e Light, 2018).

No transudato pleural, a causa mais frequente é a insuficiência cardíaca congestiva, tendo como outras causas importantes, porém com menor prevalência, o hidrotórax hepático e a síndrome nefrótica, entre outras (Feller-Kopman e Light, 2018). Em comum a essas causas de derrame pleural está a baixa concentração de proteínas totais no líquido pleural, já que fisiopatologicamente o mecanismo envolvido se deve ao desequilíbrio entre a pressão hidrostática capilar elevada e a oncótica no espaço pleural, favorecendo o acúmulo de líquido em sua cavidade. O líquido pleural normal é claro e incolor com teor proteico inferior a 2,5 g/dL (Quadro 1).

QUADRO 1 – CAUSAS DE LÍQUIDO PLEURAL TRANSUDATIVO
TRANSUDATOS PLEURAIS
Insuficiência cardíaca congestiva Cirrose hepática Síndrome nefrótica Glomerulonefrite Diálise peritoneal Hipoalbuminemia (<1,5 mg/dL) Atelectasia Obstrução de veia cava superior Pulmão encarcerado Sarcoidose Mixedema Shunt ventrículo pleural de liquor Urinotórax Hipertensão arterial pulmonar Tromboembolismo pulmonar Pericardite Migração extravascular de cateter venoso central

Fonte: Feller-Kopman e Light, 2018

Os derrames pleurais exsudativos, em razão do processo pleural primário sendo inflamatório ou infeccioso, apresentam-se ricos em proteínas e desidrogenase láctica (DHL), entre outros parâmetros. A elevada concentração de proteínas totais determina a elevação da pressão oncótica. Como consequência, o fluxo de líquido pleural caminha em direção ao espaço pleural por aumento da pressão oncótica, superando a capacidade de sua reabsorção pelos vasos linfáticos da pleura parietal (Feller-Kopman e Light, 2018).

No entanto, derrames de causa neoplásica podem se apresentar sem que estejam presentes os parâmetros usualmente esperados e que indicariam um exsudato. Cerca de 8 a 10% dos transudatos pleurais podem ser devidos a diversos tipos de câncer. Outra apresentação desafiadora são os derrames paramalignos, nos quais o líquido terá características transudativas e citologia neoplásica repetidamente negativa. A razão aventada para o referido quadro se deve a algum mecanismo que

impeça o pulmão de se expandir (“trapped lung”), por exemplo a presença de tumor endobrônquico levando à atelectasia obstrutiva (Roberts et al., 2023). Nesses casos o procedimento de VATS e/ou broncoscopia e/ou mediastinoscopia com exames no líquido pleural, análise de tecido pleural e/ou brônquico e/ou outros se fazem necessários (Quadro 2; Roberts et al., 2023).

QUADRO 2 – CAUSAS DE LÍQUIDO PLEURAL EXSUDATIVO
EXSUDATOS PLEURAIS
Infecções: viral, tuberculose, bactérias, fungos e parasitas Neoplasias: pleura ou metastáticas Paramalignidades: atelectasias, obstrução brônquica, pleurite por irradiação, outras Tromboembolismo pulmonar Doenças abdominais: pancreatite, colecistites, abscessos hepáticos ou esplênicos, perfuração esofagiana, outras Miocardite ou pericardite Ginecológicas: Síndrome de Meigs, hiperestimulação ovariana, complicações pós-parto, outras Colagenoses vasculares: artrite reumatoide, lúpus eritematose sistêmico, granulomatoses com poliangite, outras Medicamentos: nitrofurantoina, amiodarona, beta-bloquadores, outros Hemotórax Quilotórax: traumatismo ou linfomas Sarcoidose Linfomas Pseudoquilotórax: tuberculose, artrite reumatoide, derrames pleurais crônicos Miscelânea; asbestose pleural, síndrome da unha amarela, uremia, amiloidose, endometriose, queimadura elétrica, iatrogenia, outros

Fonte: Feller-Kopman e Light, 2018

1.4. Critérios de Light e Maranhão e Silva Junior para classificar exsudatos e transudatos pleurais

A SDP é conhecida pela variedade de apresentações, causas, características bioquímicas, citológicas e imunológicas, requerendo avaliação metódica e sistemática para, inicialmente ocorrer a diferenciação entre exsudato e transudato e, em seguida a definição causal final. Ainda há escassez de testes diagnósticos que possam ser

empregados isoladamente com potencial para o alcance de tal propósito. E é neste contexto que há décadas diversas estratégias de análise do líquido pleural vêm sendo propostas com rendimentos diagnósticos e complexidades variadas (Lin et al., 2021).

Classicamente o critério de Light é empregado na separação de líquidos transudativos e exsudativos, tendo sido descrito pela primeira vez por Richard Light em 1972 (Light et al., 1972). Por este critério, as relações entre proteínas totais séricas e do líquido pleural (LP) $\geq 0,5$, da DHL sérica e LP $\geq 0,6$ e a dosagem total de DHL pleural ≥ 200 U/L classificam o derrame como sendo um exsudato pleural. Em relação à DHL, passou-se posteriormente a ser usada para o LP a contagem acima de 2/3 do valor do plasma, substituindo o valor absoluto de ≥ 200 U/L como parâmetro na avaliação em paralelo com os demais descritos. No entanto, este critério, apesar de amplamente utilizado pode diagnosticar transudatos como exsudatos em cerca de 25% dos casos se o paciente encontra-se em uso de diuréticos. Isto pode ser crítico e induzir à uma classificação equivocada em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, usuários habituais desta classe farmacológica. Por outro lado, a necessidade de se obter amostra sanguínea paralelamente à coleta do líquido pleural reduz a praticidade do critério de Light (Light et al., 1972).

Pelas razões mencionadas, a ciência segue na busca por critérios que diferenciem transudatos de exsudatos pleurais com acurácia confiável e que necessite apenas do líquido pleural como fonte das informações para a elucidação diagnóstica da SDP (Maranhão et al., 2010).

Neste sentido, o critério de Maranhão e Silva Junior (2010) avançou no propósito de se utilizar apenas o líquido pleural (LP) como material biológico para investigação pela dosagem da DHL e proteínas totais. Foram por este critério alcançadas elevadas sensibilidade (99,4%), especificidade (72,6%) e acurácia

(99,2%) para o diagnóstico de exsudato quando dosados no LP acima de 328 U/L e 3,4 g/dL, respectivamente. Comparando-se com o critério clássico de Light, a acurácia foi significativamente maior ($P=0,0022$) com o critério de Maranhão e Silva Junior (Maranhão et al., 2010).

Todavia, ainda há espaço para se continuar a procura de critérios para classificar transudatos e exsudatos pleurais. Assim, determinar a presença da doença causal com dosagem única de biomarcadores no LP é extremamente importante (Maranhão et al., 2010).

1.5. Adenosina desaminase

A enzima adenosina desaminase (ADA) vem sendo considerada ao longo dos anos como um biomarcador útil no diagnóstico da tuberculose pleural. A ADA é encontrada em diversas células, predominantemente nos monócitos e linfócitos, os quais são encontrados em abundância nos derrames pleurais tuberculosos. Em regiões de alta prevalência de tuberculose e na presença de derrame linfocítico, pode-se fortemente suspeitar desta origem diante da dosagem da ADA total acima de 30 U/L ou 40 U/L, dependendo do método usado para avaliar sua atividade no líquido pleural (Silva Junior et al., 2013). Outras condições inflamatórias também respondem pela elevação da ADA no líquido pleural, como por exemplo, nos derrames pleurais parapneumônicos complicados e empiemas pleurais. Isto porque a ADA têm um importante papel na modulação imunológica e inflamatória da cavidade pleural quando presente um derrame exsudativo (Silva Junior et al., 2013). De especial interesse são os níveis elevados de ADA nos empiemas pleurais e linfomas (Yao et al., 2014).

Tendo em vista a observação anterior, o pensamento de que ADA é um biomarcador de tuberculose pleural pode ser considerada uma análise puramente simplista. Ou seja, há potencialidades diagnósticas que precisam ser exploradas em relação a esta enzima, uma vez que é um parâmetro exequível em boa parte dos laboratórios de patologia clínica, permitindo sua utilização como exame ou biomarcador isolado no líquido pleural após uma toracocentese e dispensando a realização da clássica biópsia pleural fechada com agulha de Cope (Behrsin et al., 2015).

Interessante observar que o grau de gravidade da resposta inflamatória e a relação da atividade da ADA com as alterações da função pulmonar foram revelados em grupos de pacientes com tuberculose (TB) pulmonar com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Em pacientes com TB pulmonar, o papel principal da ADA foi desempenhado pela isoenzima adenosina desaminase extracelular 2 (ADA-2), e em pacientes com TB pulmonar tendo a DPOC como comorbidade, a principal atividade encontrada foi da ADA intracelular 1 (ADA-1). Os autores concluíram que a atividade da ADA reflete a gravidade da obstrução em pacientes portadores de TB pulmonar com DPOC (Kiryukhina et al., 2018).

A ADA é encontrada em todo organismo humano, especialmente em órgãos linfóides como baço, timo e linfonodos. Possui nestas localizações atividade mais notável em linfócitos T do que em células B. Esta enzima pode ser de localização citoplasmática ou na superfície celular. Como ectoenzima, ou seja, na superfície das células hematopoiéticas, atua estimulando os linfócitos. Possui ação de catalisar o nucleosídeo adenosina e 2' desoxiadenosina em inosina e 2' desoxinosina. Sua atividade regula as concentrações de adenosina intra e extracelular, que representa um produto de degradação do nucleotídeo adenina. A ADA total é a soma de duas

isoenzimas, a ADA 1 e ADA 2. A principal isoenzima é a ADA 1 que, além de estar presente nos tecidos em geral e hemácias, encontra-se em menor proporção circulando livremente no plasma. Ela atua desenvolvendo o sistema imune adaptativo, principalmente a proliferação de linfócitos, reduzindo a atividade da adenosina por seu mecanismo catalítico, a qual possui atividade imunossupressora. Assim, é importante concluir que a ADA-1 degrada a adenosina intracelular, e ADA-2 participa da desaminação da adenosina extracelular (Silva Junior et al., 2013).

A hipótese formulada nesse trabalho foi que a ADA total pleural (ADA-P) poderá ser útil na discriminação dos derrames exsudativos como dosagem única no líquido pleural. Esta possibilidade permite grande simplificação da propedêutica que se faz necessária diante de um paciente portador de SDP, configurando-se em mais uma alternativa diagnóstica com outros critérios bioquímicos presentes na literatura (Porcel et al., 2001; Lin et al., 2021)

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a enzima adenosina desaminase total pleural (ADA-P) como um biomarcador capaz de auxiliar na classificação de transudatos e exsudatos pleurais utilizando unicamente o líquido pleural como material biológico.

2.2 Específicos:

- Calcular o valor de referência ou ponto de corte da ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais utilizando o critério da razão de verossimilhança positiva máxima no espaço da curva ROC ("Receiver Operator Characteristic");
- Avaliar os parâmetros diagnósticos da ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais utilizando o valor de referência com o critério da razão de verossimilhança positiva máxima no espaço da curva ROC;
- Avaliar se o biomarcador ADA-P possui discriminação, validação interna, calibração e utilidade clínica para classificar exsudatos e transudatos pleurais.

3.1 Diretrizes, Delineamento, População do Estudo, Critérios de Seleção e Tamanho da Amostra

As diretrizes “Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Studies (STARD)” e “The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE)” foram consultadas para melhorar a qualidade de nossa pesquisa (Bossuyt et al, 2015; Elm et al., 2007). A pesquisa foi um estudo observacional com uma coorte retrospectiva, conduzida de março de 2015 a dezembro de 2019, em dois hospitais universitários no estado do Rio de Janeiro, Brasil. O Comitê de Ética do CEP CMM/HUAP aprovou este estudo, que foi conduzido de acordo com as diretrizes da Declaração de Helsinque, sob o número 80/02 (Anexo 1). A plataforma Brasil também aprovou esse projeto como o CAAE número 48946121.9.0000.5243, em 10 de setembro de 2021, com o título “Desenvolvimento, discriminação e calibrações por validações interna e externa, para um estudo com delineamento observacional com finalidade de acurácia diagnóstica e modelos de previsão com adenosina desaminase e outros biomarcadores oriundos de toracocentese e/ou cirurgia torácica videoassistida para diagnóstico de transudatos, exsudatos, tuberculose e outras causas de síndrome de derrame pleural no Brasil” (Anexo 1). Um termo de consentimento informado para esta pesquisa foi obtido de todos os pacientes (Anexo 2).

3.2. Critérios diagnósticos de inclusão de pacientes e laboratoriais de amostras de líquido pleural

Os exames padronizados para diagnóstico da SDP foram história clínica, exame físico, radiografia de tórax e ultrassonografia pleural. Se necessário, exames de imagem adicionais eram solicitados, como por exemplo, tomografia computadorizada de tórax convencional sem contraste, tomografia de tórax por emissão de pósitrons e ressonância magnética do tórax (Roberts et al., 2013).

O diagnóstico causal da SDP foi confirmado após um ou dois procedimentos de toracocentese guiada por ultrassonografia transtorácica extracardíaca (ETUS) para retirada de amostras de líquido pleural para avaliação laboratorial, de acordo com a sequência diagnóstica propostas por diretrizes para elucidação da causa da SDP (Hooper et al., 2010; Roberts et al., 2013).

Amostras de líquido pleural (LP) foram coletadas de indivíduos sem diagnóstico etiológico da SDP. Uma amostra extra de LP sempre era armazenada no freezer (-20 graus Celsius), em frasco seco, estéril, sem anticoagulante, para outros exames ou biomarcadores além dos rotineiros a fim de complementar a investigação diagnóstica para etiologias inicialmente não suspeitadas. As avaliações de aparência, odor, leucometria, análise citopatológica e ensaios bioquímicos (proteínas totais, desidrogenase láctica, glicose, proteína C reativa titulada, pH, amilase, triglicerídeos e colesterol total e peptídeo natriurético do tipo B), além, de biomarcadores para doenças do tecido conectivo, infecções bacterianas, virais e TB pleural. O diagnóstico de transudato ou exsudato pleural foi confirmado pelo critério de Maranhão e Silva Junior (Maranhão et al, 2010). Este foi validado segundo o critério de Light, porém com dosagens de proteína total e desidrogenase láctica (LDH) total somente no LP

(Light et al., 1972). Caso a SDP persistisse sem diagnóstico causal, o paciente era encaminhado para um procedimento de cirurgia torácica vídeo-assistida (VATS) com indicação de biópsia pleural para diagnóstico histopatológico, se necessário (Eze et al., 2022).

Cabe ressaltar que o paradigma clássico de acurácia diagnóstica é baseado em estudos que comparam os resultados do teste em avaliação (“index test”, ADA-P nesse trabalho) com os resultados do padrão de referência que deve ser o melhor método disponível para determinar a presença ou ausência da condição ou doença de interesse, nesse trabalho o critério de Maranhão e Silva Junior (Rutjes et al., 2007).

3.3. Critérios diagnósticos de exclusão dos pacientes e laboratoriais de amostras de líquido pleural

Os critérios de exclusão foram contraindicações ou recusa para procedimentos cirúrgicos, uso de medicamentos imunossupressores, hemólise em líquidos pleurais, insuficiência renal crônica, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e SDP de causa indeterminada (Conesa-Buendia et al., 2020). Além disso, pacientes com níveis séricos de bilirrubina superiores a 65 mg/dL, lipídios superiores a 1500 mg/dL e fatores reumatoides superiores a 1500 UI/mL foram excluídos, pois essas dosagens bioquímicas interferem na dosagem da ADA total (Delacour et al., 2010).

3.4. Análise bioquímica da ADA total no líquido pleural (ADA-P)

A coleta, o armazenamento e o processamento adequados de LP foram observados para um diagnóstico preciso. O LP utilizado para o teste de ADA-P não

estava hemolisado (Michael e Davidson, 2016). Os LP preservados a -20 °C foram descongelados e diversos biomarcadores nas amostras foram avaliados. A ADA-P foi dosada utilizando um kit comercial com abordagem cinética. Resumidamente, o ensaio da ADA-P baseia-se na desaminação enzimática da adenosina em inosina, que é então convertida em hipoxantina pela fosforilase de nucleosídeo de purina. A hipoxantina é transformada em ácido úrico e peróxido de hidrogênio pela xantina oxidase. O peróxido de hidrogênio reage com N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilanilina e 4-aminoantipirina na presença de peroxidase para gerar um corante quinona, que foi medido de forma cinética. Uma unidade de ADA-P foi definida como a quantidade de ADA que gera um μmol de inosina a partir de adenosina por minuto a 37 °C. O ensaio foi linear de 0-200 U/L ($r^2 > 0,99$). A ultracentrifugação não afetou os resultados. O ADA-P permaneceu estável por uma semana a 4 °C. Os reagentes permaneceram estáveis por um ano se armazenados de 2 a 8 °C em frascos âmbar. A atividade de ADA no soro de humanos saudáveis tem um intervalo de valores de referência de 0 a 15 U/L (Delacour et al., 2010). Este ensaio de ADA com métodos cinéticos automatizados também foi validado para vários fluidos orgânicos (Allison et al., 2022). O método manual de Galanti e Guisti para estimativa de ADA-P demonstrou agregabilidade com o método do autoanalisador Diazyme para 90% das amostras analisadas. O método manual apresentou uniformemente valores mais altos quando comparado ao método do analisador. Um fator de correção de 2,44 foi obtido, o que permitiu efetivamente a comparabilidade entre os dois métodos de ensaio. A regressão linear entre os métodos manuais e de autoanalisador para estimativa de ADA-P encontrou em uma pesquisa um valor de $R^2=0,7161$ (Dubba et al., 2020).

3.5. Planejamento e abordagem estatística

3.5.1. Estatística descritiva e inferencial

Todos os dados quantitativos e qualitativos de nossos prontuários eletrônicos foram transferidos para uma planilha do MSEXcel versão 2010. Estatísticas descritivas e inferenciais foram analisadas utilizando uma combinação de softwares estatísticos, incluindo NCSS versão 2022 e GraphPad versão 5.0. O desempenho do biomarcador P-ADA foi avaliado com o MedCalc para Windows, versão 19.3 (MedCalc Software, Ostend, Bélgica). O método bilateral de Grubbs, que examina os valores mais extremos em ambos os lados dos dados, foi utilizado para detectar os valores discrepantes. Os dados laboratoriais foram analisados com testes estatísticos univariados. Um valor de P menor que 0,05, determinado a partir de um teste bicaudal, foi considerado indicativo de significância estatística, levando-nos a rejeitar a hipótese nula com 5% de probabilidade de erro tipo I. O teste de Shapiro e Wilk foi utilizado para avaliar as distribuições dos dados. As variáveis quantitativas com distribuição normal foram expressas como médias e desvios-padrão, e aquelas com distribuição não normal foram expressas em termos de suas medianas e intervalo interquartil (IIQ, percentis 25 e 75). Um teste t não pareado com desvio-padrão foi utilizado para comparar as médias dos dois grupos com distribuição gaussiana. Proporções foram utilizadas para expressar variáveis qualitativas ou categóricas. O teste χ^2 foi utilizado para comparar grupos e proporções. O teste não paramétrico U de Wilcoxon-Mann-Whitney foi utilizado para comparar a mediana da ADA-P entre os transudatos e exsudatos pleurais quando os dados não eram normalmente distribuídos.

3.5.2. Tamanho da amostra e técnica de amostragem

O cálculo do tamanho da amostra foi baseado na área sob a curva ROC esperada ($AUC > 0,50$), no valor nulo da AUC ($AUC = 0,50$) e na razão entre os tamanhos das amostras de casos positivos e negativos (1:2), de acordo com o software MedCalc (Negida et al., 2019). Para um nível α de 0,05 e um nível β de 0,20 (poder estatístico = 80%), seria necessária uma amostra de 19 casos no grupo positivo (exsudatos) e 38 no grupo negativo (transudatos), totalizando 57 casos. O poder estatístico do estudo dependeu de três fatores já mencionados: nível de significância estatística (α), tamanho da amostra (N) e tamanho do efeito ("effect size") que se refere tanto à magnitude populacional, quanto à estimativa baseada na amostra pesquisada. Para estimar com exatidão o tamanho do efeito estatístico da nossa amostra foi calculado o DOR ("diagnostic odds ratio") entre o grupo controle de transudatos e os casos de exsudatos (Sullivan e Feinn, 2012; Smithson, 2023). Segundo a tabela original de Ferguson (2009) um $DOR > 4$ possui um tamanho de efeito robusto ou poderoso ("strong") na comparação entre variáveis com desfechos ("outcomes") binários em tabelas de contingência de 2 x 2 (Serdar et al., 2020; Lenhard e Lenhard, 2022). Um DOR pode ser calculado pela fórmula: $DOR = (\text{Verdadeiros Positivos} / \text{Falsos Negativos}) / (\text{Falsos Positivos} / \text{Verdadeiros Negativos}) = (\text{Sensibilidade} / (1 - \text{Sensibilidade})) / ((1 - \text{Especificidade}) / \text{Especificidade})$ ou $DOR = (\text{Verdadeiros Positivos} / \text{Falsos Positivos}) / (\text{Falsos Negativos} / \text{Verdadeiros Negativos}) = (\text{Valor Preditivo Positivo} / (1 - \text{Valor Preditivo Positivo})) / ((1 - \text{Valor Preditivo Negativo}) / \text{Valor Preditivo Negativo})$ ou $DOR = \text{Razão de Verossimilhança Positiva} / \text{Razão de Verossimilhança Negativa}$ (Raslich et al., 2007).

3.5.3. Discriminação do valor de referência do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais a partir da curva ROC

Nesse trabalho uma curva ROC ("Receiver Operating Characteristic") foi calculada com o objetivo principal de avaliar o desempenho da ADA-P como um teste diagnóstico ou biomarcador para diagnosticar ou classificar ou discriminar entre exsudatos e transudatos pleurais. A curva ROC é um gráfico de probabilidade da sensibilidade do teste como coordenada y versus 1 menos sua especificidade ou taxa de falsos positivos (FPR) como coordenada x. A curva ROC é um método estatístico eficaz para avaliar o desempenho de testes diagnósticos com a vantagem de ser uma avaliação independente da prevalência da doença estudada. A partir da curva ROC foi selecionado um valor de referência ou melhor valor de corte de ADA-P para classificar exsudatos pleurais pelo método não-paramétrico de DeLong et al. (1988). Para desfechos binários, uma boa discriminação significa que o modelo separa pessoas com alto risco daquelas com baixo risco de doença (Efthimiou et al., 2024).

O critério utilizado na curva ROC para selecionar um ponto de corte "ótimo" foi a razão de verossimilhança positiva máxima (RVP) para exsudatos, a partir dos resultados calculados na curva ROC pelo software MedCalc. Assim, foi obtido um valor de referência com alta especificidade e baixa taxa de falsos positivos e falsos negativos para exsudatos (Elkahwagy et al., 2024; Hassanzad et al., 2024). De acordo com uma escala robusta, biomarcadores com uma RVP maior que 10 ou uma razão de verossimilhança negativa (RVN) menor que 0,1 têm o potencial de alterar decisões clínicas, e seus resultados são conclusivos. Biomarcadores diagnósticos com RVP entre 5 e 10 ou RVN entre 0,1 e 0,2 frequentemente fornecem informações adicionais

úteis, enquanto biomarcadores com RVP variando de 0,33 a 3 raramente alteram decisões clínicas (Ray et al., 2010).

As seguintes métricas também foram utilizadas para a discriminação do valor de referência selecionado da ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais a partir da curva ROC:

a) Razões de chances do diagnóstico (DOR ou “diagnostic odds ratio”).

O valor do DOR varia de 0 a infinito, com valores maiores indicando melhor desempenho discriminatório no teste. Um valor de 1 significa que a ADA-P não discrimina entre os pacientes com a doença (exsudatos pleurais) e aqueles sem a doença (controles ou transudatos pleurais). Valores menores que 1 indicam um teste inadequado com mais resultados negativos entre os doentes ou exsudatos pleurais (Glas et al., 2003).

b) Área sob a curva ROC (AUC), também conhecida como estatística C (“concordance” index)

A área sob a curva ROC (AUC) representa a probabilidade de um modelo de classificação binária discriminar casos com e sem uma dada condição clínica (Steyerberg, 2019). Um esquema geral de classificação da acurácia para discriminação de um biomarcador pela AUC foi proposto por Hosmer e Lemeshow (2013) e adotado por outros autores, conforme se segue: discriminação excepcional (0,90-1,0), discriminação excelente (0,80-0,90), discriminação boa/aceitável (0,70-0,80), suficiente (0,60-0,70), pobre (0,50-0,60) e biomarcador não útil (0,00-0,50). Um

valor de 0,5 indica que o modelo não é melhor do que cara ou coroa, e um valor de 1 denota discriminação perfeita (Collins et al., 2024).

c) Intervalos de confiança com 95% de probabilidade

O intervalo de confiança fornece informações valiosas sobre a provável magnitude do efeito investigado e a confiabilidade da estimativa (Phillips et al., 2022). O valor de P e o intervalo de confiança são dois métodos equivalentes para interpretar os resultados de uma análise estatística. Se nenhum dos intervalos de confiança de 95% se sobrepõe a 1 (para percentagens) ou 0 (para valores absolutos), então as diferenças são estatisticamente significativas com 95% de probabilidade ou $P < 0,05$ (Lee, 2016).

3.5.4. Parâmetros diagnósticos ou classificação de “performance” do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais a partir do valor de referência selecionado na curva ROC

Os parâmetros diagnósticos para avaliação ou classificação de “performance” utilizados nesse trabalho foram sensibilidade ou habilidade de detectar uma doença, especificidade ou habilidade de não detectar uma doença, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), razão de verossimilhança (RV) positiva (RVP) e negativa (RVN), acurácia diagnóstica ou precisão, razão de chances do diagnóstico ou DOR ou “diagnostic odds ratio” (Ranganathan, 2021).

3.5.5. Validação dos parâmetros diagnósticos do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais na ausência de um modelo de predição clínica com análise de regressão

Por conceito, a validade questiona se o teste é plausível em princípio, como, por exemplo, se possui uma base racional e biológica. Isso é particularmente relevante quando um novo teste, como a ADA-P, é concebido pela primeira vez e antes de ser incorporado na prática clínica (Bogduk, 2022).

Mesmo na ausência de um modelo de análise de regressão, os seguintes procedimentos estatísticos de validação foram utilizados nesse estudo: validação interna pelo método de “bootstrapping”, curva de calibração e índice de utilidade clínica (Van den Bruel et al., 2006; Bogduk, 2022).

- a) Validação interna pelo método de “bootstrapping” com curva de calibração ajustada para garantir a exatidão e a precisão do estudo realizado

O método clássico de “bootstrapping” com um potencial de sobreajuste da AUC foi utilizado nesse trabalho. A estimativa “bootstrap” da AUC refere-se a um método para estimar a AUC de uma curva ROC usando um software que implementa a técnica de reamostragem “bootstrap”. Este método ajuda a estimar a AUC e seu intervalo de confiança, por reamostragem de dados do conjunto de dados original com substituição e calculando a AUC para cada conjunto de dados reamostrado (Skalská e Freylich V, 2006). Aqui, um intervalo de confiança “bootstrap” (com 1000 reamostras) foi empregado para gerar um IC de 95% da AUC. Tolerância de 0,02 com 1000 réplicas foi considerada apropriada (Wu et al., 2019). Nesse trabalho, a curva de calibração

validada por bootstrapping, representou visualmente a AUC e seus intervalos de confiança a 95%.

b) Índice de utilidade clínica (CUI)

O Índice de Utilidade Clínica (do inglês, abreviado CUI) de Alex J. Mitchell foi utilizado nesse trabalho porque há mais de 30 estudos publicados até o momento. Para esse cálculo foi utilizado um aplicativo rápido baseado na web (<https://www.psych-oncology.info/cui.html>) para auxiliar na interpretação do CUI para o teste da ADA-P para o diagnóstico de exsudato pleural: utilidade clínica excelente $\geq 0,81$; boa $\geq 0,64$, mas $< 0,81$; razoável $\geq 0,49$, mas $< 0,64$; ruim $\geq 0,36$, mas $< 0,49$; e muito ruim $< 0,36$ (Mitchel, 2011).

c) Validação externa

Nesse trabalho não foi estabelecido o desempenho da ADA-P em um conjunto de dados completamente independente e não utilizados durante o desenvolvimento. A validade externa da ADA-P para classificar exsudatos pleurais deverá ser estabelecida usando dados de diferentes períodos, instituições ou regiões geográficas (Davis et al., 2020).

4.1. Tamanho da amostra

O tamanho da amostra neste estudo consistiu em 157 amostras de LP de 157 pacientes com SDP comprovadas por exames padronizados, utilizados como controles ou transudatos ($n = 33$) e derrames pleurais exsudativos com doenças inflamatórias de diversas causas ($n = 124$).

4.2. Tamanho do efeito estatístico da amostra

Nesse trabalho o DOR foi utilizado como medida de tamanho do efeito. Para o DOR foi calculado um valor em exsudatos igual a 23,26. Um DOR > 4 possui um tamanho de efeito robusto ou poderoso (“strong”) na comparação entre variáveis com desfechos (“outcomes”) binários, segundo a tabela original de Ferguson (2009).

4.3. Prevalência, características demográficas e laboratoriais

A **Tabela 1** resume a prevalência das causas de SDP entre os 157 pacientes no local do estudo e período de tempo. Exsudatos foram mais prevalentes (79%) do que transudatos (21%). A causa mais comum de transudato foi insuficiência cardíaca congestiva (79%, 26/33). Tuberculose estava presente em exsudatos (28,0%, 44/124).

Tabela 1 - Prevalência das causas da síndrome do derrame pleural avaliadas em 157 pacientes de março de 2015 a dezembro de 2019

Causa	Paciente (N)	Prevalência (%)
Transudatos*	33	21.0
Exsudatos totais	124	79.0
Tuberculose	44	28.0
Adenocarcinoma	37	23.0
Derrames parapneumônicos simples	15	9.0
DPPC e empiema	8	5.0
Linfoma	7	5.0
Carcinoma de células escamosas	7	5.0
Outros exsudatos‡	6	4.0

Fontes: Hospital Universitário Antônio Pedro (Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro) e Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro)). **Abreviações:** DPPC: derrames parapneumônicos complicados. *Transudatos: insuficiência cardíaca congestiva (n = 26), insuficiência renal crônica (n = 3), cirrose hepática com ascite (n = 3) e baixos níveis de proteína total no soro (n = 1). ‡Outros exsudatos: síndrome de pseudo-Meigs (n = 1), síndrome de Dressler (n = 3), quilotórax (n = 1) e leucemia (n = 1).

As características demográficas e os níveis de P-ADA dos 157 pacientes são apresentadas na **Tabela 2**. Os valores medianos da variável P-ADA foram significativamente diferentes ($P < 0,0001$) entre exsudatos (18,4 UI/L; IIQ, 9,85-41,4) e exsudatos sem tuberculose pleural (11,0 UI/L; IIQ, 7,25-19,75) e transudatos (6,85; IIQ, 2,67-11,26). Ao contrário das idades ($P=0,0001$), não houve diferença estatisticamente significativa na proporção de ambos os sexos entre os grupos de transudato e exsudato, conforme determinado pelo teste Qui-quadrado (homens, $P=0,9415$; mulheres, $P=0,9416$).

Tabela 2 - Características demográficas e níveis de adenosina desaminase pleural total em 157 casos de exsudatos e transudatos

Variável	Exsudato (n=124)	Transudato (n=33)	Estatística (valor de P)
Idade, anos, mediana (IQR)*	58,0- (41,5-73,5)	76,0 (63,0-86,25)	U=895 (0,0001)
Masculino, n (%)	58 (47,0)	16 (48,0)	$\chi^2=0,005$ (0,9415)
Feminino, n (%)	66 (53,0)	17 (52,0)	$\chi^2=0,005$ (0,9416)
P-ADA, U/L, mediana (IQR)*	18,4 (9,25-41,4)	6,85 (2,67-11,26)	U=679,5 (0,0001)
P-ADA, U/L, sem TB pleural, mediana (IQR)*	11,0 (7,25-19,75)	6,85 (2,67-11,26)	U=735,5 (0,0001)

Nota estatística: *Teste de normalidade de Shapiro-Wilk: $P < 0,05$; **Abreviações:** IQR: intervalo interquartil de 75%-25%; ADA-P: adenosina desaminase pleural total; TB: tuberculose; U=teste não paramétrico de Mann-Whitney; χ^2 : teste não paramétrico de Qui-quadrado

4.4. Resultados da determinação, discriminação e critério para seleção do valor de referência do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos e pleurais a partir da curva ROC e AUC

A **Figura 1** mostra a curva ROC dos valores de P-ADA para classificação e diagnóstico de exsudatos e discriminação do ponto de corte selecionado. Para exsudatos, a AUC foi de 0,820 (IC 95%, 0,751-0,877; $Z = 8,157$; SE, 0,0393), com um valor de P altamente significativo ($P < 0,001$). O ponto de corte ideal no espaço da curva ROC foi identificado como o nível que proporciona a maior razão de probabilidade positiva e foi de $\geq 22,0$ U/L. Para transudatos, a AUC foi de 0,8245 (IC 95%, 0,7470-0,9020; SE, 0,03955), com um valor de P altamente significativo ($P < 0,0001$). O ponto de corte ideal no espaço da curva ROC foi determinado como $<22,0$ U/L.

A fórmula de Bayes foi aplicada para calcular a probabilidade pós-teste da ADA-P para classificar entre exsudatos e transudatos pleurais: Probabilidade pós-teste = (probabilidade pré-teste x LR+) / [(probabilidade pré-teste x LR+) + (1 - probabilidade pré-teste)]. Uma probabilidade pós-teste de classificação correta dado um resultado positivo (ADA-P $\geq$ 22,0 U/L) foi de aproximadamente 98%.

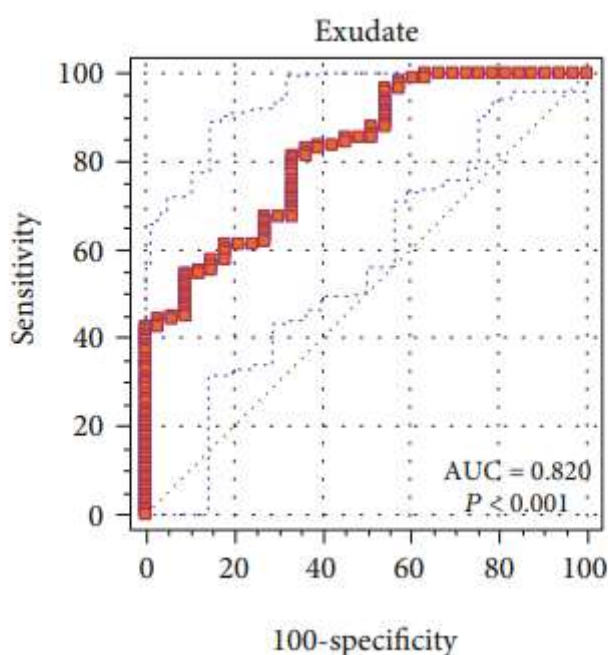


Figura 1 – Gráfico de sensibilidade versus 1-especificidade da curva ROC para todos os pontos de corte possíveis dos valores do líquido pleural da adenosina desaminase (ADA-P) para a classificação ou diagnóstico, discriminação e valor de referência de exsudatos. AUC para discriminação entre exsudatos e transudatos. O ponto de corte ideal da ADA-P maior ou igual a 22,0 U/L foi determinado pelo método que proporcionou a razão de verossimilhança positiva máxima na curva ROC. AUC = 0,820 (IC de 95%, 0,751-0,877; Z = 8,157; SE, 0,0393; P < 0,001). **Abreviações:** IC: intervalos de confiança; AUC: área sob a curva ROC; SE: erro padrão; Z-score indica quantos desvios-padrão de um valor observado está da média de um grupo de referência. Z positivo: o valor está acima da média.

4.5. Parâmetros diagnósticos e tamanho do efeito estatístico para desempenho técnico do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais

Os parâmetros diagnósticos para desempenho técnico do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos pleurais a partir do valor de referência selecionado ou ponto de corte estatisticamente avaliados a partir dos resultados da curva ROC são mostrados na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Parâmetros diagnósticos do biomarcador adenosina desaminase pleural total (ADA-P) após a seleção do melhor ponto de corte para exsudatos e transudatos pleurais de acordo com a razão de verossimilhança positiva máxima no espaço sob a curva ROC em 157 casos de exsudatos e transudatos

Parâmetro Diagnóstico	Exsudato (n = 124)	Transudato (n = 33)	Valor de P
Melhor ponto de corte (U/L)*	≥22,0	<22,0	
Sensibilidade (%)	44,35 (35,4-53,5)	96,88 (83,78-99,92)	<0,05
Especificidade (%)	96,98 (83,0-99,0)	42,92 (34,01-52,29)	<0,05
Valor preditivo positivo (%)**	98,11 (88,0-99,0)	29,83 (26,48-33,42)	<0,05
Valor preditivo negativo (%)**	31,0 (27,0-34,0)	98,27 (89,06-99,75)	<0,05
Razão de verossimilhança positiva	14,64 (2,11-101,9)	1,7 (1,44-2,01)	<0,05
Razão de verossimilhança negativa	0,57 (0,50-0,70)	0,07 (0,01-0,49)	<0,05
Razão chance diagnóstico (DOR)	23,26 (3,08-176,75)	24,28 (144,0-4,10)	<0,05
Acurácia ou validade preditiva (%)	54,25 (46,0-62,0)	53,77 (45,57-61,83)	<0,05
Área sob a curva ROC, AUC (%)	82,0 (75,1-87,7)	-	<0,001
Prevalência da doença (%)**	79,0	21,0	<0,0001

Nota estatística: O valor de P e o intervalo de confiança são dois métodos equivalentes para interpretar os resultados de uma análise estatística. Se nenhum dos intervalos de confiança de 95% (IC) se sobrepõe a 1 (para percentagens) ou 0 (para valores absolutos), então as diferenças são significativas estatisticamente ($P < 0,05$). (Lee, 2016). * A probabilidade pós-teste de classificação correta para exsudato pleural dado um resultado positivo da ADA-P foi de aproximadamente 98% (teorema de Bayes). Teste de Qui-quadrado ($X^2=19,3973$; $P=0,00001$) para verificar se os grupos de exsudatos e transudatos, após dicotomizados com o valor de ADA-P igual 22,0 U/L, eram independentes e possuíam uma associação entre o valor de referência selecionado e a classificação ou diagnóstico de exsudato. ** Esses valores dependem da prevalência da doença.

O valor da DOR nesta pesquisa foi calculado para exsudatos pleurais com um valor igual a 23,26 (**Tabela 3**). Um DOR > 4 possui um tamanho de efeito estatístico robusto ou poderoso (“strong”), segundo a tabela original de Ferguson (2009).

4.6. Validação dos parâmetros diagnósticos do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais na ausência de análise de regressão: validação interna, calibração por “bootstrapping”, curva de calibração e índice de utilidade clínica

A **Tabela 4** mostra a validação interna por bootstrapping do intervalo de confiança de 95% da área sob a curva ROC após 1000 reamostras para a classificação de exsudato pleural pela enzima adenosina desaminase total.

Tabela 4 - Validação interna com calibração por bootstrapping do intervalo de confiança de 95% da área sob a curva ROC (AUC) após 1000 reamostragens para a classificação de exsudato e transudato pleural com adenosina deaminase pleural total (ADA-P)

Desenvolvimento (AUC)	Validação interna pelo método de bootstrapping com a técnica de “optimism correction”		Variação	Qui-quadrado
	Observado	Esperado		P
IC 95%			%	
Mínimo	0,751	0,736	-1,99	0,092 (P = 0,7612)
Máximo	0,877	0,883	+0,68	0,027 (P = 0,8703)

Nota estatística: tolerância de 2% com 1000 replicações foi considerada apropriada. A correção de otimismo no bootstrapping é uma técnica usada para ajustar a tendência dos modelos de superestimar seu desempenho quando avaliados com os mesmos dados com os quais foram treinados, um fenômeno conhecido como “otimismo” ou “overfitting aparente”. Ela essencialmente estima o quanto o desempenho do modelo é inflado usando os próprios dados de treinamento e, em seguida, subtrai essa inflação do desempenho aparente para obter uma estimativa corrigida mais realista. No contexto da AUC, um IC de 95% para a AUC corrigida forneceu um intervalo que se espera conter a AUC verdadeira e não inflada com 95% de confiança (Iba et al., 2021). **Abreviações:** IC de 95%: Intervalo de Confiança de 95%; AUC: área sob a curva ROC.

A **Figura 2** mostra a curva de calibração, no contexto de validação interna pelo método de “bootstrapping”.

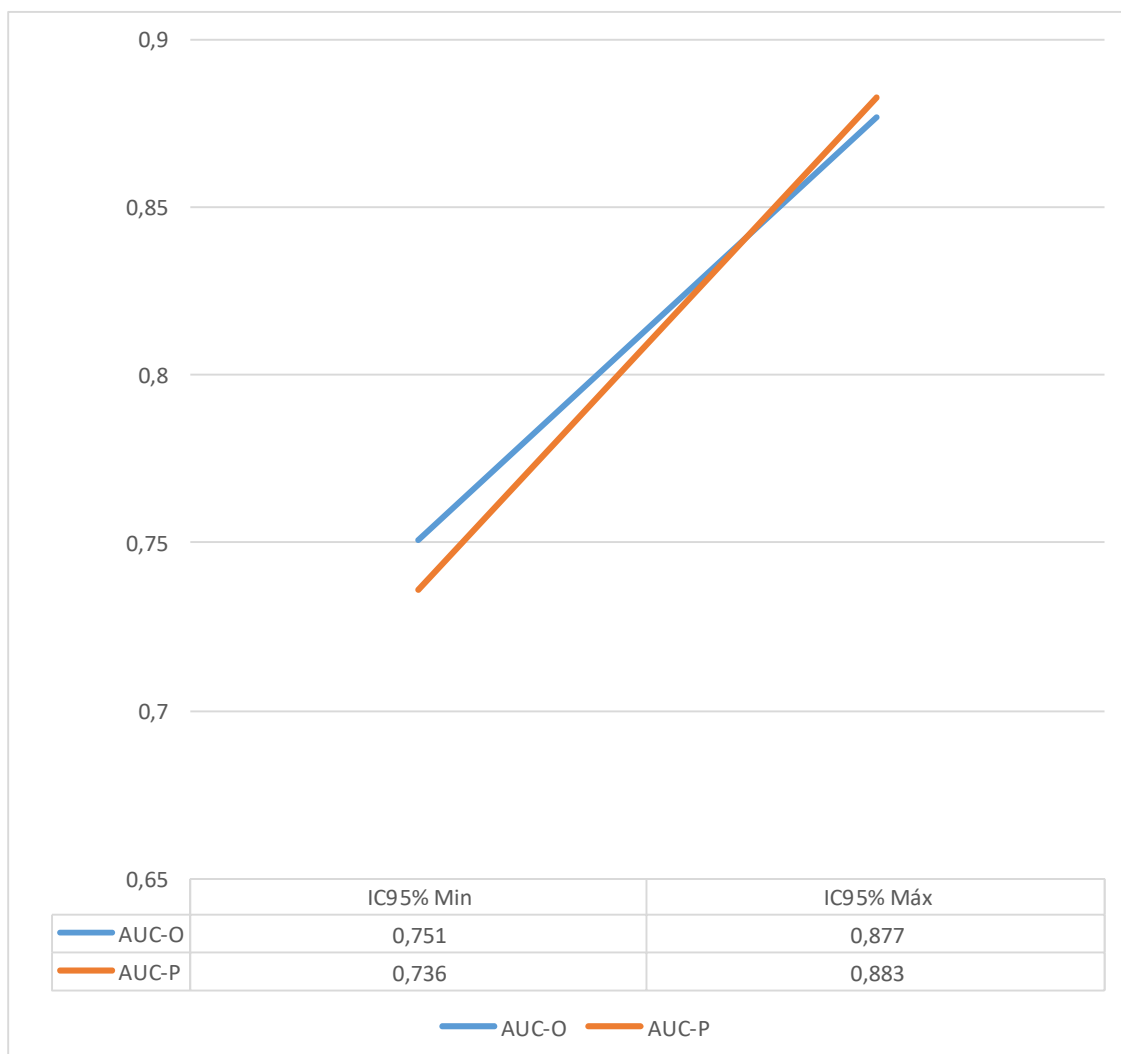


Figura 2 – Curva de calibração para validação interna da ADA-P para classificação de exsudatos pleurais pelo método de bootstrapping com 1000 reamostras. **Nota estatística:** A curva de calibração validada por bootstrapping, representou visualmente que a AUC da pesquisa teve muito bom poder discriminatório (AUC=0,80-0,90) na previsão do resultado. Como esta é uma análise univariável, nenhum ajuste foi feito para potenciais fatores de confusão. Essa curva de calibração comparou as probabilidades previstas (no eixo x) com as probabilidades observadas (no eixo y). Um modelo bem calibrado, representado pela curva de calibração segue de perto a linha diagonal ou linha de 45 graus (onde as probabilidades previstas e observadas são idênticas), indicando que as previsões do modelo se alinham com os resultados reais. Uma linha traçada assim representa a calibração perfeita, onde a probabilidade prevista corresponde perfeitamente à probabilidade observada (Steyerberg, 2009). **Abreviações:** IC, intervalos de confiança; AUC, área sob a curva ROC; Min, mínimo; Máx, máximo; O, observada; P, Prevista.

O índice de utilidade clínica (CUI) de Mitchell (2011) da ADA-P para o diagnóstico de exsudatos pleurais foi calculado com um valor quantitativo de (CUI=2,309) com uma interpretação qualitativa de utilidade clínica excelente.

5.1. Contextualização do biomarcador ADA-P

O termo "biomarcador", é um acrônimo para "marcador biológico". Os biomarcadores são ferramentas essenciais na medicina moderna, auxiliando na detecção precoce de doenças, no desenvolvimento de diagnósticos e tratamentos mais eficazes, assim como na prevenção de complicações de saúde. Um biomarcador é uma característica definida que é medida como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas biológicas a uma exposição ou intervenção, incluindo intervenções terapêuticas. Os biomarcadores podem incluir características moleculares, histológicas, imagem ou fisiológicas. Assim podem ser moléculas, proteínas, genes, ou até mesmo características fisiológicas, como pressão arterial ou frequência cardíaca. Um biomarcador não é uma medida de como um indivíduo se sente, funciona ou sobrevive. Isto é, devem ser usados para avaliar a presença, atividade ou resposta a uma doença ou tratamento (Atkinson et al., 2001).

As categorias de biomarcadores incluem: biomarcador de suscetibilidade/risco, diagnóstico, monitoramento, prognóstico, preditivo, multicomponente, resposta e segurança. Nesse trabalho a ADA-P foi utilizada como um biomarcador de diagnóstico para detectar ou confirmar ou classificar a presença de uma doença ou condição de interesse. Nesse caso, para identificar indivíduos com um subtipo da SDP: exsudatos pleurais (BEST, 2016; Ou et al., 2021).

Os parâmetros mais básicos que precisam ser estabelecidos em relação a qualquer teste clínico são que ele demonstre um grau suficiente de confiabilidade e validade. Se esses dois parâmetros importantes não forem atendidos, o valor do teste em auxiliar os médicos a chegar a um diagnóstico, formular um plano de tratamento ou monitorar o progresso de um paciente é questionável (Bruno, 2011). Uma validação

adequada é importante para biomarcadores e resultados clínicos (COAs ou “clinical outcome assessments”). Ela garante que um biomarcador, ferramenta ou instrumento seja adequado para o uso proposto (BEST, 2016). Para biomarcadores, é fundamental estabelecer que o teste mede/avalia o que se pretende medir e que o biomarcador (por meio de seu teste) tenha a capacidade de prever ou mensurar o conceito clínico relevante (ou seja, validação clínica). Ao estabelecer se os biomarcadores são adequados à finalidade, a validação informa essencialmente qualquer uso potencial de um biomarcador com seus parâmetros diagnósticos validados (BEST, 2016).

5.2. Controle de vieses em estudo retrospectivo

O viés em pesquisa pode ocorrer em várias fases do processo, desde a concepção do estudo até a interpretação dos resultados. Ele pode afetar a seleção dos participantes, a coleta de dados, a análise e até mesmo a publicação dos resultados. Em um estudo retrospectivo, como essa pesquisa, vários tipos de vieses podem surgir, incluindo viés de seleção, viés de informação e viés de memória. Para mitigar esses vieses, os pesquisadores podem empregar diversas estratégias, como definir criteriosamente os critérios de inclusão, utilizar ferramentas de mensuração validadas e garantir a consistência na coleta de dados. Nesse estudo os vieses foram evitados porque os dados foram registrados em uma série de pacientes apenas com SDP (casos e controles), com o objetivo de tratamento seguindo um protocolo padronizado para diagnóstico da causa. Em séries de casos, o viés de informação pode ocorrer, mas pode ser reduzido pela seleção de um grupo controle apropriado (Norvell, 2010).

Cabe mencionar que embora os estudos retrospectivos possam, às vezes, refletir melhor a prática clínica de rotina do que os estudos prospectivos, eles podem falhar em identificar todos os pacientes elegíveis e, geralmente, resultam em dados de qualidade inferior, com mais dados ausentes. Nesse trabalho, o autor teve esse cuidado nos critérios de inclusão e exclusão e vale ressaltar que no início da coleta de nosso banco de dados o estudo possuía um delineamento prospectivo.

5.3. Justificativa do número da amostra (N) e tamanho do efeito estatístico

Os principais erros encontrados em estudos científicos são: hipótese falha e delineamento inadequado; grupo controle inadequado; viés de espectro, exagero dos resultados da análise; correlações espúrias, tamanho amostral inadequado, análise circular (criação de viés ao selecionar as propriedades dos dados retrospectivamente); utilização de estudos estatísticos inadequados e distorção falaciosa das análises; adição de novas covariáveis “post hoc” para tornar os valores de P significativos (“P-hacking”); interpretação excessiva de resultados limitados ou insignificantes (subjetivismo); confusão de correlações; modelos de regressão múltipla falhos; confusão entre valor de P e significância clínica; apresentação inadequada dos resultados (tabelas, gráficos e figuras errôneos) e tamanho de efeitos (Serdar et al., 2020).

A justificativa do tamanho da amostra em pesquisa clínica é crucial para garantir a validade e confiabilidade dos resultados. Essa diretriz é essencial para a credibilidade do estudo e para que os resultados sejam generalizados para a população alvo. Um tamanho de amostra inadequado pode levar a resultados inconclusivos, erros de interpretação ou falta de poder para detectar efeitos

relevantes. Um tamanho muito grande de amostra pode gerar custos desnecessários e expor um número excessivo de participantes. Assim uma amostra não deve ser grande ou pequena, mas adequada para os objetivos da pesquisa. A quantidade ou tamanho da amostra deve e foi calculada matematicamente para que a pesquisa atingisse os seus objetivos com poder estatístico mais eficiente possível (Serdar et al., 2020).

O cálculo matemático do tamanho da amostra envolve a determinação do número mínimo de participantes necessários para detectar um efeito ou diferença clinicamente relevante, considerando fatores como poder estatístico, nível de significância e erro aceitável. As seguintes etapas foram realizadas para justificar o tamanho da amostra nessa pesquisa: definimos a pergunta e o desfecho (“outcome”); as variáveis foram identificadas; o nível de significância (α) foi determinado; o poder estatístico ($1 - \beta$) foi definido e o tamanho do efeito da amostra foi estimado (Serdar et al., 2020).

O tamanho da amostra e o poder do estudo estão diretamente relacionados ao tamanho do efeito do estudo. Por que o tamanho do efeito é tão importante? Porque fornece informações sobre o quão bem a(s) variável(is) independente(s) predizem a variável dependente. Um tamanho de efeito baixo significa que as variáveis independentes não predizem bem porque estão apenas ligeiramente relacionadas à variável dependente. Um tamanho de efeito forte significa que as variáveis independentes são ótimos preditores da variável dependente. Portanto, o tamanho do efeito é clinicamente importante para avaliar a eficiência com que os médicos podem prever os resultados das variáveis independentes (Serdar et al., 2020).

O tamanho do efeito (ou “effect size” em inglês) é uma medida quantitativa da força ou magnitude de um fenômeno em um estudo estatístico. Ele ajuda os

pesquisadores a entender a extensão do efeito. Isto é, ajuda a entender os resultados de um teste de hipótese e complementa a significância estatística. O tamanho do efeito nos permite fornecer uma estimativa do escopo de nossas descobertas. Em estatística, o tamanho do efeito se refere a uma maneira de quantificar o tamanho da diferença entre dois grupos.

Exemplos de medidas de tamanho do efeito encontrados na literatura: d de Cohen, g de Hedges, Delta de Glass e AUC, entre outros. Tamanho do efeito como medidas de associação: risco relativo (RR), DOR (“diagnostic odds ratio”), r de Pearson, coeficiente de determinação (R^2) e eta ao quadrado ou η^2 . Nas correlações o tamanho do efeito é baseado na variação explicada (r de Pearson, R^2 , V de Cramer e η^2). Nas diferenças o tamanho do efeito tem como base as diferenças entre os grupos (por exemplo, Cohen’s d , Glass’ Δ , Hedges’ g , DOR e RR (Martinez-Camblor et al., 2020; Sullivan e Feinn, 2012; Maher et al., 2013; Salgado, 2018).

Os tamanhos dos efeitos podem ser determinados a partir de pesquisas anteriores, meta-análises ou estudos-piloto para garantir a consistência com a literatura existente. Na presente pesquisa não foram encontrados esses critérios para escolha do tamanho do efeito. Assim escolhemos o DOR, considerando a nossa amostra com tamanhos diferentes entre o grupo de transudatos e exsudatos pleurais e a distribuição não paramétrica dos valores de ADA-P. Desta forma, para um cálculo do tamanho do efeito precisa ser observado se ele é adequado para testes paramétricos e não paramétricos (Lakens, 2013).

Para o DOR nesta pesquisa foi calculado para exsudatos pleurais um valor igual a 23, 26 (**Tabela 3**). Um DOR > 4 possui um tamanho de efeito robusto ou poderoso (“strong”), segundo a tabela original de Ferguson (2009). Outras medidas de tamanho do efeito estatístico como o eta ao quadrado (η^2) não foram calculadas

porque à distribuição de nossos dados foram não paramétricas, de acordo com a **Tabela 2** (Lenhard e Lenhard, 2022; Cohen, 1992).

Ou seja, o tamanho do efeito é uma medida essencial em estatística que complementa a significância estatística, fornecendo informações sobre a magnitude da diferença e a relevância prática dos resultados de um estudo. A significância estatística é o aspecto menos importante dos resultados de uma pesquisa. Esses resultados também devem ser apresentados e descritos em termos de medidas de magnitude, ou seja, não apenas se um tratamento afeta as pessoas, mas também em que medida ele as afeta. O produto principal de uma pesquisa é uma ou mais medidas de tamanho do efeito, não valores de P (Sullivan e Feinn, 2012).

5.4. Prevalência de tuberculose pleural e outras causas de SDP no estudo

A tuberculose é a causa mais prevalente de derrame pleural exsudativo em adultos na nossa causuística e no Brasil (**Tabela 1**). Outros trabalhos no Brasil comprovam essa prevalência (Behrsin et al., 2015; Seiscento et al., 2009; Machado et al., 2016).

Na população pediátrica brasileira (crianças e adolescentes), os derrames pleurais parapneumônicos são uma complicação relativamente comum (5-40%) da pneumonia adquirida na comunidade de causa viral ou bacteriana. No entanto, na prática clínica, a maioria dos derrames é pequeno e não necessita de investigação adicional ou tratamento específico além da antibioticoterapia. Um pequeno número requer drenagem ou intervenção cirúrgica. A tuberculose pleural é a segunda maior causa de SDP nessa faixa etária, relacionada à alta incidência de tuberculose no Brasil (Fischer, 2016).

Cabe destacar que a ultrassonografia pleural é essencial na avaliação de derrames pleurais em crianças e adultos, pois permite identificar a presença, quantidade, características como septações e localização do líquido, além de auxiliar na realização de procedimentos cirúrgicos minimamente invasivos como a toracocentese. Esse exame é a modalidade de imagem de grande importância, mas ainda pouco utilizado na prática clínica no Brasil, uma vez que permite a diferenciação entre a consolidação, o derrame pleural com septações e espessamento e fibrose nas pleuras, evoluindo com encarceramento pulmonar e distúrbio ventilatório restritivo (Amorim et al., 2016). A ultrassonografia transtorácica extracardíaca (ETUS) fez parte do padrão de orientação e guia de uma toracocentese, além de sugestão de diagnóstico imagético com utilização de uma sonda de alta frequência (5 a 10 MHz). Porém, as imagens ultrassonográficas de líquido pleural anecóico não distinguiram de forma confiável entre líquido pleural transudativo e exsudativo. Entretanto, apresentações como septações complexas ou ecogenicidade homogênea são altamente indicativas de líquido pleural exsudativo (Evans et al., 2021). As características de loculação ou septação na ETUS são específicas e preditivas para derrame pleural exsudativo. A presença de septação e loculação foi associada a uma maior probabilidade de derrame parapneumônico complicado ou empiema (Huang et al., 2025).

5.5. Características demográficas da população estudada

A mediana da idade e do sexo dos pacientes em nosso estudo (Tabela 2) foram semelhantes às de um estudo com uma amostra populacional brasileira de uma região metropolitana no Estado do Rio de Janeiro (Behrsin et al., 2015). O sexo feminino foi mais prevalente do que o masculino em exsudatos e transudatos, embora as diferenças não tenham sido significativas, conforme determinado pelo teste Qui-quadrado (**Tabela 2**). Houve diferença estatisticamente significativa entre as idades dos pacientes com exsudato e transudato pleural conforme mostrado na Tabela 2 ($P < 0,0001$, teste de Mann-Whitney $U=895,0$). Com certeza as causas dos transudatos mencionadas na **Tabela 1** foram importantes para esses resultados.

5.6. Resultados laboratoriais da ADA-P

Os valores medianos da atividade de ADA-P de pacientes com exsudatos e transudatos foram de 18,4 U/L e 6,85 U/L, respectivamente, com um valor de P altamente significativo ($P = 0,0001$), conforme determinado pelo teste de Mann-Whitney ($U=679,5$) mostrado na **Tabela 2**. Embora ADA-P tenha sido identificada como um biomarcador mais acurado disponível na prática clínica para tuberculose pleural, constatamos que a ADA-P classificou transudatos e exsudatos pleurais mesmo quando as amostras de tuberculose foram excluídas ($U = 735,5$; $P < 0,0001$), conforme demonstrado na Tabela 2. Não encontramos na literatura nacional e internacional resultados em artigos para comparação.

A revisão de literatura encontrou somente um estudo brasileiro específico que demonstrou uma relação entre os níveis de ADA-P e doença inflamatória pleural com

diversas causas presentes nos exsudatos pleurais, além de tuberculose pleural (Maranhão et al., 2025). Um editorial com elogios sobre esse artigo foi publicado posteriormente mencionando no título a associação entre “adenosina desaminase no derrame pleural como uma ponte para o diagnóstico da fisiopatologia da inflamação” (Shi et al., 2025). Assim, com um valor de referência $\geq 9,00$ U/L pelo critério de Youden, a ADA-P também pode indicar a natureza inflamatória dos derrames pleurais exsudativos em relação aos transudatos não inflamatórios, com níveis mais elevados indicando maior probabilidade de tuberculose pleural. No entanto, níveis elevados de ADA-P não são exclusivos da tuberculose pleural. Dosagens muito altas (> 150 U/L) são incomuns na tuberculose pleural, e diagnósticos alternativos, como empiema bacteriano, linfoma, leucemia ou mieloma múltiplo, devem ser considerados, em conjunto com outros biomarcadores, avaliação por imagem e avaliação clínica (Le et al., 2019; Choe et al., 2024).

5.7. Discussão sobre o poder de discriminação do valor de referência do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais utilizando a curva ROC e AUC

Um biomarcador diagnóstico somente deve ser utilizado na prática clínica após processo de descoberta, desenvolvimento, discriminação e validação. Um estudo pode apresentar boa discriminação, distinguindo com precisão os níveis de risco ou diagnóstico de uma doença, mas ainda apresentar baixa calibração devido a uma incompatibilidade entre as probabilidades previstas e observadas. Além disso, um modelo bem calibrado pode apresentar baixa discriminação. Portanto, um modelo de

predição robusto deve apresentar boa discriminação e calibração (Efthimiou et al., 2024).

Cabe mencionar que a curva ROC não é um modelo de predição clínica, mas sim uma ferramenta que também pode ser usada para avaliar o desempenho de um modelo de predição clínica ou qualquer classificador binário. Não foi utilizado nesse trabalho um modelo de predição clínica, por exemplo, como a regressão logística simples ou multivariada para avaliação de predição clínica da ADA-P para exsudatos pleurais. Nesse trabalho, o valor da AUC foi uma métrica resumida da curva ROC que refletiu a capacidade da ADA-P de discriminar entre indivíduos com exsudatos pleurais e transudatos pleurais (Verbakel et al., 2020; Çorbacioğlu e Aksel, 2023).

Uma curva ROC é um gráfico da taxa de verdadeiros positivos (sensibilidade) em função da taxa de falsos positivos (100-especificidade) para diferentes pontos de corte (“cutoff”) de um biomarcador. Cada ponto de corte na curva ROC após ser construída por um “software apropriado” representa um par sensibilidade/especificidade correspondente a um limite de decisão específico ou valor de referência ou “cutoff”. A área sob a curva ROC (AUC) é uma medida de quão bem um parâmetro consegue distinguir entre dois grupos diagnósticos (doente/normal ou controle). A área sob a curva ROC (AUC) representa a probabilidade de o modelo classificar corretamente uma doença em estudo. Neste trabalho (**Figura 1**), o método não paramétrico (empírico) foi utilizado para calcular a curva ROC de acordo com nossa análise da normalidade das distribuições de dados de ADA-P (DeLong et al., 1988). Em conclusão, as curvas ROC também podem ser utilizadas para orientar a seleção de limites apropriados para a tomada de decisões clínicas em testes diagnósticos (Verbakel et al., 2020).

O espaço da curva ROC nesse trabalho foi usado para identificar valores de corte ótimos da ADA-P na discriminação entre pacientes com exsudatos pleurais e transudatos pleurais (utilizados como controles). Vários métodos são introduzidos na literatura para determinar o ponto de corte ideal para valor de referência de um teste, exame ou biomarcador. Deve-se observar que cada um desses métodos possuem premissas únicas, e a seleção de cada um se baseia na importância da sensibilidade versus a especificidade do teste ou valores preditivos. Os métodos mais importantes relatados na literatura são a estatística J de Youden, distância euclidiana, índice de união (IU), abordagem de custo, razão de verossimilhança positiva máxima (LR + ou RVP), produto máximo de sensibilidade e especificidade, número necessário para diagnosticar erroneamente (NNM), método analítico, razão de chances de diagnóstico (DOR) e valor de P mínimo (Hassanzad et al., 2024).

Dos métodos mencionados, o mais utilizado na literatura internacional pelos pesquisadores é o índice de Youden (J). Ele utiliza a distância vertical máxima da curva ROC a partir do ponto (X, Y) na diagonal. O índice de Youden maximiza a diferença entre a taxa de sensibilidade (Se) e falsos positivos, ou seja, maximiza a porcentagem de classificação correta. Índice de Youden = $Se + Sp - 1$. Portanto, o ponto de corte ótimo é calculado maximizando Se + Sp em diferentes pontos de corte (Hassanzad et al., 2024). Entretanto, na prática clínica, é essencial saber como um resultado específico de um teste ou biomarcador prevê o risco de doença. Sensibilidades e especificidades não fazem isso. Elas descrevem como a anormalidade (ou normalidade) prevê resultados específicos de teste. Valores preditivos fornecem probabilidades de doença para resultados específicos de teste, mas dependem da prevalência da doença na amostra do estudo e raramente podem ser generalizados para além do estudo (exceto quando o estudo é baseado em uma

amostra aleatória adequada, como às vezes é o caso de estudos de triagem populacional). Razões de verossimilhança fornecem uma solução, pois podem ser usadas para calcular a probabilidade de doença ou anormalidade, enquanto se adaptam para probabilidades anteriores variáveis da chance de anormalidade de diferentes contextos. As razões de verossimilhança são calculadas usando as proporções de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos em relação aos falsos positivos e falsos negativos. Essas proporções são determinadas pela sensibilidade e especificidade do teste, e não são influenciadas pela prevalência da doença em estudo (Deeks e Altman, 2004). Assim, a razão de verossimilhança positiva (LR+) é a razão entre verdadeiros positivos e falsos positivos. A razão de verossimilhança negativa (LR-) é a razão entre falsos negativos e verdadeiros negativos. Os pesquisadores podem escolher um valor de corte que maximize LR+ ou minimize LR-. Quanto maior for o LR+ mais informações ele terá para o teste diagnóstico, mas com o LR- ocorre exatamente o oposto, isto é, se for próximo de zero, o teste tem melhor desempenho (Hassanzad et al., 2024).

Assim, o método ou critério "ideal" para escolher um ponto de corte depende dos objetivos específicos e do contexto do teste ou biomarcador diagnóstico estudado. Tanto o índice de Youden quanto as razões de verossimilhança positivas são ferramentas valiosas, mas abordam diferentes aspectos da precisão diagnóstica. O índice de Youden é útil para maximizar a precisão geral de um teste. As razões de verossimilhança positivas, por outro lado, são úteis para entender como um resultado positivo altera a probabilidade de doença e podem ser usadas para avaliar a utilidade clínica de um teste. As razões de verossimilhança ajudam a avaliar a força da evidência diagnóstica. Em última análise, a decisão de qual método utilizar deve

considerar o impacto clínico da classificação incorreta de casos e a disponibilidade de dados para cada método (Unal, 2017; Schlattmann, 2022).

Nesse trabalho escolhemos o método da razão de verossimilhança positiva máxima (LR+) para selecionar o valor de referência da ADA-P para classificar entre exsudatos e transudatos pleurais, embora a LR+ não se transforme diretamente em porcentagem. A razão de verossimilhança ou fator Bayesiano é uma medida que indica a força de uma evidência a favor ou contra uma hipótese, e não uma probabilidade em si. No entanto, a LR+ pode ser usada para calcular a probabilidade pós-teste pelo teorema de Bayes que expressa em porcentagem a probabilidade pós-teste de classificação correta de um exsudato pleural dado um resultado positivo da ADA-P no valor de referência selecionado. O ponto de corte ideal (ADA-P $\geq 22,0$ U/L) para a classificação de exsudatos pleurais foi selecionado no espaço da curva ROC como o nível que proporcionou a maior razão de probabilidade positiva para classificar entre exsudatos e transudatos pleurais (**Figura 1, Tabela 3**). Pelo teorema de Bayes, a probabilidade pós-teste de um exsudato pleural dado um resultado positivo da ADA-P foi de aproximadamente 98% (Bayes, 1763). Não foi encontrado na literatura pesquisada um valor para comparação.

O teorema de Bayes recebeu este nome devido ao pastor e matemático inglês Thomas Bayes (1701 – 1761), que estudou como calcular a distribuição para o parâmetro de probabilidade de uma distribuição binomial. Esse teorema é uma fórmula matemática que descreve a probabilidade de um evento ocorrer dado que outro evento já ocorreu. Ele relaciona a probabilidade condicional de um evento A, dado que o evento B ocorreu, com as probabilidades individuais de A e B e a probabilidade de B dado A. O teorema de Bayes é uma ferramenta poderosa na inferência estatística e na tomada de decisões, especialmente quando se trata de

combinar informações prévias com novas evidências para obter estimativas mais precisas (Habibzadeh e Habibzadeh, 2019).

A curva ROC para exsudatos pleurais é mostrada na **Figura 1**. A curva ROC para transudatos não é mostrada. Não encontramos referências na literatura para comparações. A AUC calculada para exsudatos foi de 0,820 (IC de 95%, 0,751-0,877; $P < 0,001$), e a calculada para transudatos foi de 0,8245 (IC de 95%, 0,7470-0,9020, $P < 0,0001$). De acordo com a classificação de Hosmer e Lemeshow (2013), uma AUC igual a 0,820 é indicativa de excelente discriminação (0,80-0,90). Na prática, AUC maiores que 0,90 são consideradas incomuns e indicam um desempenho excepcional do modelo de classificação binária. Uma AUC próximo a 1 significa que o modelo tem uma alta capacidade de discriminar entre as classes positiva e negativa, ou seja, classifica corretamente exemplos positivos e negativos (Çorbacioğlu e Aksel, 2023).

5.8. Discussão sobre os parâmetros diagnósticos do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais

Os parâmetros diagnósticos de um biomarcador referem-se às características que determinam a utilidade de um biomarcador para fins de diagnóstico. Estes parâmetros incluem a sensibilidade ou a capacidade do teste de identificar corretamente indivíduos com a doença ou verdadeiros positivos; a especificidade ou a capacidade do teste de identificar corretamente indivíduos sem a doença (verdadeiros negativos); o valor preditivo positivo (VPP) ou probabilidade de um resultado positivo indicar a presença da doença; o valor preditivo negativo (VPN) ou probabilidade de um resultado negativo indicar a ausência da doença; a razão de verossimilhança (RV) ou fator “Bayesian” é a medida de quanto um resultado positivo

(RVP) ou negativo (RVN) altera a probabilidade de ter ou não ter a condição/doença. A RV em testes diagnósticos é uma medida que quantifica como um resultado de um teste muda a probabilidade de uma doença, comparando a probabilidade de um resultado em pacientes doentes com a probabilidade do mesmo resultado em pacientes sem a doença ou controles. A RVP indica quanto a probabilidade de doença aumenta com um resultado positivo no teste. Quanto maior a RVP, maior a probabilidade de doença após um resultado positivo. Uma RVN indica quanto a probabilidade de doença diminui com um resultado negativo no teste. Quanto menor a RVN, menor a probabilidade de doença após um resultado negativo (Deeks e Altman, 2004); a acurácia diagnóstica ou precisão, é definida como a probabilidade geral de que um paciente seja classificado corretamente (Deeks e Altman DG, 2004); a razão de chances do diagnóstico ou DOR (“diagnostic odds ratio”), é aplicada para expressar a força da associação entre o resultado do teste e a doença (Glas et al, 2003); e o valor de referência ou ponto de corte (“cutoff point”) que é um limiar de referência que separa os resultados positivos dos negativos. A escolha do valor de corte afeta tanto a sensibilidade quanto a especificidade do teste (**Tabela 3**).

O objetivo dos parâmetros diagnósticos foi demonstrar o desempenho técnico da ADA-P, ou seja, avaliar se a ADA-P como biomarcador para classificar exsudatos e transudatos pleurais fornece medições consistentes para os valores reais desconhecidos (**Tabela 3**). A avaliação de desempenho ou performance de um biomarcador avalia a capacidade do biomarcador de detectar com precisão uma condição ou doença. Em um estudo sobre testes diagnósticos, parâmetros diagnósticos são importantes e representam aspectos diferentes do desempenho técnico de um biomarcador. Os parâmetros diagnósticos são as ferramentas utilizadas para alcançar e avaliar essa precisão. Compreender e utilizar ambos é crucial para

tomar decisões clínicas confiáveis sobre testes diagnósticos. Os parâmetros diagnósticos são muito sensíveis às características da população no qual o teste é avaliado (Ou et al., 2021; Matsui et al., 2021).

Analisando a **Tabela 3**, encontramos um valor de RVP de 14,64. Esse resultado significa que um paciente com exsudato pleural tem 14,64 vezes mais probabilidade de obter um resultado positivo para exsudato pleural com o teste ADA-P, no valor de referência selecionado (≥ 22 U/L), do que um paciente com transudato pleural. Quanto maior o valor da RVP, mais forte a evidência de que a doença está presente após um resultado positivo.

Ainda na **Tabela 3**, observamos os resultados da razão de chances diagnóstica (DOR). A DOR é uma estatística familiar em epidemiologia, expressando a força da associação entre exposição e doença. Assim, foi calculada para expressar a força da associação entre um resultado de ADA-P (U/L) e o diagnóstico de exsudato pleural. Um valor de DOR 23,26 (ou seja, um “odds ratio” = 23) significou que a odds (chance relativa) da ADA-P para classificar um exsudato pleural foi 23 vezes maior em comparação com o grupo de transudato pleural com o valor de referência selecionado de ADA-P (≥ 22 U/L).

A interpretação geral do valor de DOR=23 deve ser realizada da seguinte maneira: $OR = 1 \rightarrow$ Não há associação entre exposição e desfecho; $OR > 1 \rightarrow$ Associação positiva (a exposição aumenta o risco do desfecho); $OR < 1 \rightarrow$ Associação negativa (a exposição protege contra o desfecho). $OR = 23 \rightarrow$ Associação muito forte entre a exposição e o desfecho (**Tabela 3**). Não encontramos na literatura pesquisada trabalhos para comparação com a **Tabela 3**. Concluímos que o DOR de um teste é a razão entre as chances de positividade na doença em relação às chances de positividade no não doente ou controle. $DOR = RVP/RVN$. O DOR oferece vantagens

consideráveis em meta-análises de estudos diagnósticos que combinam resultados de diferentes estudos em estimativas resumidas com maior precisão. Um DOR oferece vantagens quando usado em regressão logística com problemas de diagnóstico. A regressão logística pode ser usada para construir regras de decisão, refletindo o valor diagnóstico combinado de uma série de variáveis diagnósticas ou preditoras independentes (Glas et al., 2003).

Ainda analisando a **Tabela 3**, observamos que os valores de P e os intervalos de confiança a 95% de probabilidade (IC95%) foram ferramentas importantes para a interpretação dos resultados dos parâmetros diagnósticos nesse estudo. Ambos foram considerados em conjunto para obter uma compreensão completa dos resultados e significância estatística. Se o intervalo de confiança não incluísse o valor nulo (zero), isso indicava que a diferença foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$), pois o valor nulo (sem efeito) não era uma opção plausível dentro do intervalo. Além disso, a largura ou amplitude do intervalo de confiança indica a precisão da estimativa. Um intervalo mais estreito significava uma estimativa mais precisa. Em conclusão, os valores de P e os IC 95% foram ferramentas complementares usadas na análise desse estudo para avaliar a significância estatística dos resultados observados e estimar o intervalo de valores plausíveis para os verdadeiros parâmetros diagnósticos do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais a partir do valor de referência selecionado (**Tabela 3**).

Também na **Tabela 3**, a acurácia foi empregada para mensurar a eficiência da ADA-P para classificar exsudatos pleurais e possibilitar, assim, “medir” os achados verdadeiros (verdadeiros positivos e verdadeiros negativos), alvo de todo teste diagnóstico. A acurácia de 54% para exsudato pleural expressou em número (ou proporção), os resultados classificados corretamente pelo teste diagnóstico da ADA-

P para classificar exsudatos pleurais – **Tabela 3** (Ranganathan, 2021; Schlattmann, 2022).

Poucos estudos anteriores investigaram a utilidade da ADA-P para a classificação ou diagnóstico de exsudatos pleurais. Semelhante ao nosso trabalho, encontramos somente três outros, mas sem a profundidade e robustez estatística apresentada nessa pesquisa. A **Tabela 5** foi construída para comparação e discussão (Mehta et al., 1970; Jadhav e Bardapurkar, 2007; Atalay et al., 2005).

Tabela 5 – Comparação para discussão entre os parâmetros diagnósticos do biomarcador adenosina desaminase pleural total (ADA-P) após a seleção do melhor ponto de corte para classificação de exsudatos pleurais com referências encontradas na literatura

Referência para exsudato pleural, N	ADA-P - Cutoff - U/L (Critério de seleção)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Observações
Trabalho atual. Maranhão et al. (2025), N=157	≥22,0 (LR+ máxima)	44,35	96,98	Acurácia= 54%; DOR=23,26 (único estudo mencionando)
Mehta et al. (2015), N=101	>35,0 (Curva ROC sem definir critério de seleção)	96,47	86,67	Acurácia =95%
Jadhav e Bardapurkar (2007), N=60	22,0 (Critério de seleção não mencionado)	90,0	90,0	Não menciona curva ROC. Tabela de contingência 2x2 com cutoff arbitrário?
Atalay et al. (2005), N=359	≥15,3 (Índice de Youden)	85,8	82,3	Acurácia similar ao gradiente de albumina e proteínas totais (82%)

Abreviaturas: N=número total de casos. LR+=razão de verossimilhança máxima positiva. DOR=Odds ratio diagnóstico

Em pesquisa clínica, não encontrar muitos resultados para comparações na revisão de literatura pode significar vários aspectos. As interpretações mais comuns são pouca evidência científica prévia (lacuna na literatura). Essa constatação pode indicar que a pergunta da pesquisa é nova ou pouco explorada, o que é tanto uma oportunidade quanto um desafio. Oportunidade porque estamos investigando algo original e relevante, contribuindo com novos conhecimentos. Desafio porque existe

menos base teórica e dados prévios para fundamentar nossa hipótese ou metodologia. O que esses achados implicam para nossa pesquisa clínica? 1) justificam nossa pesquisa porque pode reforçar a relevância de realizar esse estudo com ADA-P; 2) exigiu maior rigor metodológico. Como havia poucos estudos anteriores, nosso trabalho deveria ter uma robustez estatística e metodologia ampla para gerar evidência confiável; e 3) exigiu uma boa revisão de literatura porque mesmo com poucos estudos diretos, foi importante explorar outros estudos relacionados, modelos teóricos ou dados indiretos (Snyder, 2019; Rowley e Slack, 2004).

Uma boa revisão de trabalhos publicados anteriormente tem muitas vantagens. Primeiramente, evita o desperdício de trabalho repetitivo e, portanto, economiza recursos financeiros. Em segundo lugar, é um caminho para criar novas ideias a partir do trabalho de outros pesquisadores, preenchendo as lacunas de pesquisa em trabalhos anteriores e buscando entender o que ainda não se sabe sobre um tópico específico. Nosso trabalho preencheu uma lacuna na pesquisa da ADA-P para classificação de exsudatos pleurais porque a robustez estatística não foi encontrada nos poucos trabalhos existentes na revisão da literatura (Skaik, 2013).

Seguindo orientação de vários autores, nossa revisão de literatura procurou ser um resumo abrangente e ter análise crítica das poucas pesquisas publicadas sobre ADA-P para diagnosticar exsudatos pleurais. Assim, a usamos para resumir o conhecimento existente fornecendo uma visão geral sobre SDP, tratamento, método diagnóstico ou prática de saúde; identificar lacunas e destacar tópicos onde as evidências são insuficientes ou inconsistentes; apoiar nossas conclusões clínicas para ajudar médicos e pesquisadores a compreender a força das evidências para a

classificação de exsudatos pleurais; e justificar a necessidade de novos estudos ou ensaios clínicos sobre o tema (Leite et al., 2019).

5.9. Discussão sobre diferenças de interpretação estatística sobre o “odds ratio” calculado a partir da curva ROC (“diagnostic odds ratio” ou DOR) e sobre o “odds ratio” calculado e derivado de um modelo de predição clínica com cálculos de regressão

A razão de chances (RC) ou odds ratio (OR) de um modelo de regressão e a razão de chances do diagnóstico (DOR) conceitualmente vinculada à curva ROC são bastante diferentes em significado, origem e interpretação, embora ambos estejam relacionados à avaliação da relação entre um preditor e um desfecho (Szumilas, 2010).

A DOR é calculada usando sensibilidade e especificidade e indica o quanto as chances de um resultado positivo no teste aumentam no grupo doente em comparação com o grupo não doente. A DOR tem como utilidade e objetivo ajudar a avaliar a precisão ou acurácia diagnóstica geral de um teste ou biomarcador. A DOR ao ser interpretada reflete o quão fortemente um teste discrimina entre positivos e negativos em um valor de referência selecionado, mas é uma propriedade desse limite específico, não dos coeficientes do modelo. A DOR não depende da prevalência da doença; no entanto, assim como a sensibilidade e a especificidade, depende dos critérios usados para definir a doença e seu espectro de condições patológicas do grupo examinado (valor de referência, gravidade da doença, fase, estágio, comorbidade, etc (Simundic, 2009).

Por outro lado, a razão de chances de um modelo de regressão quantifica a mudança nas chances do desfecho (“outcome”, por exemplo, doença) para uma mudança de uma unidade em uma variável preditora, mantendo os outros preditores constantes. A OR do modelo de regressão possui a finalidade e a utilidade para ajudar a compreender o impacto individual de cada variável preditora no resultado, isto é, a OR de uma regressão avalia a relação entre os preditores e o resultado dentro de um modelo (Sperandei, 2014).

Nesse trabalho (**Tabela 3**) o valor do DOR foi calculado para exsudatos pleurais com um valor igual a 23,26. Como já mencionado um DOR > 4 possui um tamanho de efeito estatístico robusto ou poderoso (“strong”), segundo a tabela original de Ferguson (2009). Um “Diagnostic Odds Ratio” de 23 significa que a “odds” (chance) de um resultado positivo da ADA-P (valor de referência $\geq 22,0$ U/L) para exsudatos pleurais, são 23 vezes maiores em pacientes com exsudato pleural em comparação àquelas sem a doença (transudato pleural). Em termos práticos, um DOR elevado como 23 indica que a ADA-P é altamente eficaz na discriminação entre indivíduos com e sem exsudato pleural, sendo um bom discriminador da presença de exsudato pleural (Glas et al., 2003).

Nesse trabalho (**Tabela 3**), além do DOR=23,26, o IC a 95% foi de (3,08-176,75). O intervalo de confiança (IC) de 95% foi usado para estimar a precisão do DOR. No entanto, como observamos, o que significa um IC a 95% amplo? Isto é, variando de um valor muito baixo (3,08) a um valor muito alto (176,75). Significa que há muita incerteza em torno da estimativa. Isso pode ocorrer devido a tamanho pequeno da amostra (não foi caso dessa pesquisa), dados insuficientes para determinar a estimativa com precisão (também não foi o caso dessa pesquisa) ou alta variabilidade nos dados (amostra não paramétrica). Nessa pesquisa certamente a

última resposta é a mais adequada e justifica os valores calculados e apresentados nas **Tabelas 2 e Tabela 3**.

Cabe lembrar, que diferente do valor de P, o IC de 95% não relata a significância estatística de uma medida. Na prática, o IC de 95% é frequentemente usado como um *proxy* para a presença de significância estatística (Szumilas, 2010).

Para aprimorar a estimativa do DOR os seguintes métodos foram utilizados no desenvolvimento desse trabalho: delineamento do estudo e coleta de dados (maior tamanho de amostra do que necessária, o que reduziu o erro aleatório na estimativa da DOR); viés de verificação foram evitados o que garantiu que todos os pacientes recebessem o mesmo padrão de referência; o DOR foi complementado com razões de verossimilhança, área sob a curva ROC e intervalos de confiança (Huang et al., 2018).

5.10. Discussão sobre a validação do desempenho ou “performance” dos parâmetros diagnósticos do biomarcador ADA-P para classificar exsudatos e transudatos pleurais na ausência de análise de regressão: validação interna, calibração por “bootstrapping”, curva de calibração e índice de utilidade clínica

Os resultados dos estudos de acurácia diagnóstica nem sempre são validados em diversas pesquisas publicadas na literatura especializada. A validação do desempenho de testes diagnósticos sem análise de regressão é uma abordagem que deveria ser comum na literatura. Essa abordagem é válida, especialmente em estudos em estágio inicial ou na avaliação de um único biomarcador ou teste diagnóstico. Porém, existem limitações estatísticas que são ausência de ajuste para fatores de

confusão (idade, sexo, e outros vários diferentes preditores independentes) e superestimação do desempenho se a validação interna for muito otimista. Todavia, é possível avaliar a AUC de múltiplos testes diagnósticos combinados ou somente um teste “index” utilizando as ferramentas da curva ROC. Nesse trabalho, o desempenho da ADA-P para classificar exsudatos pleurais foi validado internamente usando métricas de diagnóstico univariadas e técnicas de reamostragem (Van den Bruel et al., 2006; Skalská e Freylich, 2006).

Nosso objetivo com a validação interna desse trabalho foi quantificar o desempenho preditivo do modelo em dados de participantes reamostrados do conjunto de dados de desenvolvimento da nossa casuística, ou seja, utilizamos dados da mesma população de pacientes utilizada para desenvolver o modelo e tentamos avaliar o desempenho do modelo. A validação interna concentra-se na reprodutibilidade e visa especificamente garantir que as avaliações do desempenho do modelo utilizando o conjunto de dados de desenvolvimento sejam honestas, ou seja, que o otimismo não as influencie (Van den Bruel et al., 2006).

O termo validação, embora amplamente utilizado, é enganoso, pois indica que estudos de validação de modelos levam a uma resposta “sim” (boa validação) ou “não” (validação ruim) sobre o desempenho do estudo. No entanto, o objetivo da validação de modelos estatísticos é quantificar o seu desempenho preditivo em dados de participantes reamostrados do conjunto de dados de desenvolvimento (validação interna) ou em outros dados de participantes independentes que não foram utilizados para o desenvolvimento do modelo ou validação externa (Moons et al., 2015).

A validação interna é uma componente central da estatística, pois se refere à capacidade de um estudo estabelecer uma relação causal verdadeira entre uma variável independente (ADA-P, nesse trabalho) e uma variável dependente (exsudato

pleural, nessa pesquisa), sem que haja interferência de fatores externos ou variáveis de confusão. Ela garante que os resultados observados são uma consequência direta da manipulação do experimento, e não de coincidências, influências ou fatores não controlados. Os fatores-chave que a validação interna controla na pesquisa de biomarcadores diagnósticos são sobreajuste, estabilidade e robustez do modelo, métricas de desempenho, controle de viés, desequilíbrio de classe, estimativa de variância, viés de seleção de características, reprodutibilidade e viés de otimização do modelo (Steyerberg, 2019). Assim, a validação interna da ADA-P nessa pesquisa foi crucial para avaliar seu desempenho e confiabilidade usando os dados originais do estudo (**Tabela 4**). Ela ajudou a garantir que a ADA-P detectasse com precisão o diagnóstico de exsudato pleural e forneceu resultados significativos para a prática clínica. A validação interna estimou o grau de erro aleatório, proporcionando confiança nos resultados do teste antes de sua utilização em cenários reais, isto é, a validação interna avaliou o desempenho do modelo dentro do mesmo conjunto de dados a partir do qual o modelo foi desenvolvido (**Tabela 4**). Foi fundamental evitar superestimar o desempenho da ADA-P devido a sobreajustes ou padrões aleatórios nos dados (Van den Bruel et al., 2006).

O objetivo de construir uma curva de calibração da validação interna nesse trabalho foi avaliar o quão bem as probabilidades previstas na AUC da curva ROC se ajustassem com os resultados reais ou observados. Em termos mais simples, nossa curva de calibração verificou que existiu uma concordância entre as probabilidades previstas e observadas como demonstrado na **Figura 2** (van Calster et al., 2019).

5.10.1. Discussão sobre o método clássico de “bootstrapping” para validação interna e calibração do biomarcador ADA-P na ausência de um modelo de regressão

A validação interna nesse trabalho foi avaliada por meio de um método clássico como “bootstrapping” que, geralmente, leva a resultados mais estáveis e menos tendenciosos do que outras técnicas de validação interna (Moons et al., 2015; Efthimiou et al., 2024). Assim, o método “bootstrapping” foi o tipo de técnica de validação interna usada para a calibração desse estudo. Uma calibração pode ser definida como a concordância entre os resultados observados e as previsões. A validação interna deve sempre ser realizada, mesmo na ausência de um modelo de predição clínica com análise de regressão, sendo o “bootstrapping” o método preferido, entre outros encontrados na literatura como a validação cruzada e a análise de amostra dividida (Steyerberg e Harrell FE, 2015). No “bootstrapping”, o conjunto de dados completo é reamostrado diversas vezes com substituição, com estatísticas sendo geradas em cada reamostragem, e as estatísticas de cada reamostragem são mescladas de maneira específica (Ou et al., 2021; Elkahwagy et al., 2024). A abordagem bootstrap não requer suposições distributivas (Ying et al., 2021).

O “bootstrapping” nesse trabalho foi utilizado para derivar estimativas ótimas de validade interna, conforme demonstrado na **Tabela 4**. Os intervalos de confiança da AUC observados e esperados sem significância estatística pelo teste do Qui-quadrado ($P > 0,05$) validam internamente nossos resultados. Ainda analisando a Tabela 4, também podemos concluir que as estimativas “bootstrap” produzem resultados muito semelhantes às estimativas binormais. Em média, o “bootstrap” fornece limites de confiança mais estreitos do que as estimativas binormais e não

paramétricas. O “bootstrap” é mais útil, principalmente, quando as distribuições são fortemente assimétricas, como nesse trabalho (**Tabela 4**). Os intervalos de confiança “bootstrap” são mais estreitos do que os não paramétricos, principalmente para pequenas amostras de dados (Skalská e Freylich, 2006).

Na **Tabela 4** uma tolerância de menos de 2% com 1000 replicações foi considerada apropriada. A correção de otimismo no “bootstrapping” é uma técnica usada para ajustar a tendência dos modelos de superestimar seu desempenho quando avaliados com os mesmos dados com os quais foram treinados, um fenômeno conhecido como “otimismo” ou “overfitting aparente”. Ela essencialmente estima o quanto o desempenho do modelo é inflado usando os próprios dados de treinamento e, em seguida, subtrai essa inflação do desempenho aparente para obter uma estimativa corrigida mais realista. No contexto da AUC, um IC de 95% para a AUC corrigida forneceu um intervalo que se espera conter a AUC verdadeira e não inflada com 95% de confiança (Iba et al., 2021). Não foram encontradas referências na literatura para discussão e comparação (**Tabela 5**).

5.10.2. Discussão sobre a curva de calibração para validação interna da ADA-P para diagnosticar exsudatos pleurais na ausência de um modelo de regressão

Um modelo de predição robusto deve apresentar boa discriminação e calibração (Eddy et al., 2012; Matsui et al., 2021). Nesse trabalho, foi mostrada a importância da calibração e discriminação da ADA-P para diagnóstico de exsudatos pleurais na ausência de um modelo de predição clínica, como a regressão logística,

entre outros. Nossa curva de calibração representou graficamente a probabilidade prevista de exsudato pleural em relação ao resultado real observado da AUC derivada da curva ROC (**Figura 1, Figura 2**). Um modelo perfeitamente calibrado tem uma curva de calibração que é uma linha reta com inclinação de 1, o que significa que a probabilidade prevista é exatamente igual à frequência observada do evento (van Calster et al., 2019; Collins et al. (2024).

A curva de calibração do trabalho (**Figura 2**) examinou a precisão das previsões da AUC em termos de suas estimativas de probabilidade (van Calster et al., 2019; Collins et al., 2024). Ela ajudou a avaliar o quão bem um modelo de previsão está calibrado, ou seja, se suas previsões são consistentes com as probabilidades observadas. Nesse trabalho, a curva de calibração foi construída plotando as probabilidades previstas do modelo em relação aos resultados observados do IC 95 da AUC (**Figura 2**). Uma curva de calibração é avaliada ou analisada comparando visualmente o gráfico com uma linha diagonal ideal (onde as probabilidades previstas e observadas estão perfeitamente alinhadas). Desvios da linha ideal indicam problemas de calibração, como superestimação ou subestimação de probabilidades. Uma calibração ideal, então, segue perto a linha diagonal, isso indica uma boa calibração, o que significa que as probabilidades previstas do modelo são confiáveis e consistentes com os resultados observados. Uma curva de calibração insatisfatória se desvia significativamente da diagonal, isso sugere que as previsões do modelo não são confiáveis. Isso pode ser devido a sobreajuste, suposições inadequadas do modelo ou outros problemas (Steyerberg, 2019; Steyerberg et al., 2010).

O “bootstrapping” ajuda a estimar a incerteza na curva de calibração, criando múltiplas curvas a partir de diferentes amostras “bootstrap”. Isso fornece uma avaliação mais robusta da calibração do modelo do que depender de uma única curva

de calibração a partir dos dados originais. Em resumo, uma curva de calibração é uma ferramenta visual que ajuda a avaliar a precisão e a confiabilidade de um modelo de previsão, comparando suas probabilidades previstas com os resultados reais observados. A reamostragem “bootstrap” fornece um método para estimar a estabilidade e a variabilidade do modelo. Uma curva de calibração, no contexto de um modelo construído usando a curva ROC e a análise da AUC, ajuda a avaliar o alinhamento das probabilidades previstas do modelo com os resultados observados (Steyerberg, 2019; Steyerberg et al., 2010; Skalská e Freylich, 2006; Ying et al., 2021).

5.10.3 – Discussão sobre o índice de utilidade clínica da ADA-P para classificar exsudatos pleurais

A utilidade clínica de um teste diagnóstico envolve avaliar seu impacto nos resultados dos pacientes, na tomada de decisões clínicas e na utilização de recursos de saúde. As instituições de medicina laboratorial devem adotar padrões para determinar a utilidade clínica como parte de seus Sistemas de Qualidade. A utilidade clínica é o grau em que um teste diagnóstico é útil na prática clínica, informação que não é clara apenas com base na sensibilidade, especificidade e escores ROC convencionais. A utilidade clínica depende de três fatores principais: discriminação, ocorrência e aceitabilidade. O terceiro é difícil de quantificar matematicamente. A maioria dos métodos diagnósticos considera apenas um fator (Bowling e Badrick, 2023).

Nesse trabalho, utilizamos a proposta de Mitchell (2011). O índice de utilidade clínica (CUI) da ADA-P para o diagnóstico de exsudatos pleurais foi calculado com um valor quantitativo de 2,30 (CUI=2,309) com uma interpretação qualitativa de utilidade

clínica excelente. Esse cálculo foi realizado a partir de um “software” específico, cujo resultado quantitativo foi derivado do produto entre a sensibilidade e o valor preditivo positivo da ADA-P. A interpretação do resultado em uma escala qualitativa é a seguinte: CUI $\geq 0,81$, utilidade clínica excelente; CUI $\geq 0,64$, utilidade clínica boa; e CUI $\geq 0,49$, utilidade clínica satisfatória; CUI $< 0,49$, utilidade clínica insatisfatória (Mitchell, 2011; Bolboacă, 2019).

Outro índice de utilidade clínica encontrado na literatura depende da acurácia diagnóstica, da probabilidade pré-teste e das consequências clínicas dos resultados do biomarcador em análise. Não possui um “software” específico para resultado e o seu cálculo manual é complexo. (Åsberg et al., 2019).

6. CONCLUSÕES

Em concordância com os objetivos do trabalho e análise dos resultados concluímos que:

- 1) A enzima adenosina desaminase total pleural (ADA-P) é um biomarcador diagnóstico que auxilia na classificação de transudatos e exsudatos pleurais utilizando somente o líquido pleural como material biológico;
- 2) O valor de referência da ADA-P para classificar exsudatos pleurais utilizando o critério da razão de verossimilhança positiva máxima no espaço da curva ROC ("Receiver Operator Characteristic") foi maior ou igual a 22,0 U/L pelo método enzimático validado;
- 3) Os parâmetros diagnósticos da ADA-P para classificar exsudatos pleurais, com uma prevalência de 79% e utilizando o valor de referência com o critério da razão de verossimilhança positiva máxima no espaço da curva ROC foram, sensibilidade de 44%; especificidade de 96%; valor preditivo positivo e negativo de 98% e 31%, respectivamente; razão de verossimilhança positiva e negativa de 14,0 e 0,57, respectivamente; razão de chance do diagnóstico de 23,0 e acurácia de 54%;
- 4) O biomarcador ADA-P demonstrou possuir discriminação, validação interna, calibração e utilidade clínica para classificar exsudatos pleurais.

- 5) Essas conclusões podem ser interpretadas na perspectiva de que o uso do teste ADA-P não é apenas confiável, mas também altamente eficaz na distinção entre exsudados e transudatos pleurais. Sendo assim, configura-se em biomarcador útil e mais um passo na busca pela simplificação do diagnóstico diferencial da SDP.

A simplificação do diagnóstico diferencial entre exsudato e transudato pleural por método mais objetivo representa um avanço relevante para a prática clínica, ampliando sua praticidade. Os achados desta pesquisa reforçam tal propósito, contribuindo para tornar essa abordagem mais efetiva.

As conclusões alcançadas reforçam a importância de pesquisas que visem contemplar o princípio básico de reverter os esforços científicos em benefício do diagnóstico e tratamento da população, bem como manter o caminho aberto para a continuidade de descobertas no campo da SDP.

Allison TR, Hunsaker JJH, La'ulu SL, Genzen JR. Evaluation of an adenosine deaminase (ADA) assay in serum, pleural, pericardial, peritoneal, and cerebrospinal fluids on the Roche cobas c501 analyzer. **Clin Biochem** [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2025 May 16];109–110:57–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36122696/>

Amorim LEAG, Camargos PAM, Almeida MB de, Gomide LD, Pereira GT, Ibiapina C da C. Abordagem do derrame pleural parapneumônico em crianças sob a forma de mapa conceitual. **Rev Med Minas Gerais** [Internet]. 2016 [cited 2025 Jun 16];26(Suppl 0):S38–43. Available from: <https://www.rmmg.org/artigo/detalhes/1986>

Åsberg A, Mikkelsen G, Odsæter IH. A new index of clinical utility for diagnostic tests. **Scand J Clin Lab Invest** [Internet]. 2019 Nov 17 [cited 2025 Aug 20];79(8):560–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31675254/>

Atalay F, Ernam D, Hasanoglu HC, Karalezli A, Kaplan Ö. Pleural adenosine deaminase in the separation of transudative and exudative pleural effusions. **Clin Biochem**. 2005 Dec;38(12):1066–70. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2005.07.009.

Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clin Pharmacol Ther** [Internet]. 2001 Jan 1 [cited 2025 Jun 13];69(3):89–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11240971/>

Bayes T. An essay towards solving a problem in the doctrine of chances. By the late Rev. Mr. Bayes, FRS, communicated by Mr. Price, in a letter to John Canton, AM FRS. **Philos Trans R Soc Lond** [Internet]. 1763 Dec 31 [cited 2025 Jun 25];53:370–418. Available from: <https://doi.org/10.1098/rstl.1763.0053>

Beattie P, Nelson R. Clinical prediction rules: what are they and what do they tell us? **Aust J Physiother** [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2025 Jun 13];52(3):157–63. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0004951406700241>

Behrsin RF, da Silva CT, Cardoso GP, Barillo JL, de Souza JBS, de Araújo EG. Combined evaluation of adenosine deaminase level and histopathological findings from pleural biopsy with Cope's needle for the diagnosis of tuberculous pleurisy. **Int J Clin Exp Pathol** [Internet]. 2015 [cited 2025 Jun 15];8(6):7239–45. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4525955/>

Bogduk N. On understanding the validity of diagnostic tests. **Interv Pain Med** [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2025 Aug 17];1:100127. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2772594422001236>

Bolboacă SD. Medical diagnostic tests: A review of test anatomy, phases, and statistical treatment of data. **Comput Math Methods Med** [Internet]. 2019 [cited 2025 Aug 17];2019:1891569. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6558629/>

Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig L, et al. STARD 2015: An updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. **BMJ** [Internet]. 2015 Oct 28 [cited 2025 May 16];351. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26511519/>

Bowling F, Badrick T. Methods for determining clinical utility. **Clin Biochem** [Internet]. 2023 Nov 1 [cited 2025 Sep 7];121–122:110674. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009912023002023>

Bruno P. The importance of diagnostic test parameters in the interpretation of clinical test findings: The Prone Hip Extension Test as an example. **J Can Chiropr Assoc** [Internet]. 2011 Jun [cited 2025 May 18];55(2):69. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3095582/>

Cavanaugh JE, Neath AA. The Akaike information criterion: Background, derivation, properties, application, interpretation, and refinements. **Wiley Interdiscip Rev Comput Stat** [Internet]. 2019 May 1 [cited 2025 Jun 3];11(3):e1460. Available from: <https://doi.org/10.1002/wics.1460>

Charalampidis C, Youroukou A, Lazaridis G, Baka S, Mpoukovinas I, Karavasilis V, et al. Pleura space anatomy. **J Thorac Dis** [Internet]. 2015 Feb [cited 2025 Apr 29];7(Suppl 1):S27. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4332049/>

Chien PF, Khan KS. Evaluation of a clinical test. II: Assessment of validity. **BJOG** [Internet]. 2001 [cited 2025 May 18];108(6):568–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11426889/>

Choe J, Shin SH, Jeon K, Huh HJ, Park H-D, Jeong B-H. Features which discriminate between tuberculosis and haematologic malignancy as the cause of pleural effusions with high adenosine deaminase. **Respir Res**. 2024;25:17. doi:10.1186/s12931-023-02645-6. PMID: 38178065; PMCID: PMC10765929

Collins GS, Dhiman P, Ma J, Schluskel MM, Archer L, van Calster B, et al. Evaluation of clinical prediction models (part 1): from development to external validation. **BMJ** [Internet]. 2024 Jan 8 [cited 2025 May 25];384:e074819. Available from: <https://www.bmj.com/content/384/bmj-2023-074819>

Conesa-Buendía FM, Llamas-Granda P, Atencio P, Cabello A, Górgolas M, Largo R, et al. Adenosine deaminase as a biomarker of tenofovir mediated inflammation in naïve HIV patients. **Int J Mol Sci** [Internet]. 2020 May 2 [cited 2025 May 16];21(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32438744/>

Çorbacioğlu ŞK, Aksel G. Receiver operating characteristic curve analysis in diagnostic accuracy studies: A guide to interpreting the area under the curve value. **Turk J Emerg Med** [Internet]. 2023 Oct 1 [cited 2025 Jun 20];23(4):195–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38024184/>

Davis KD, Aghaeepour N, Ahn AH, Angst MS, Borsook D, Brenton A, et al. Discovery and validation of biomarkers to aid the development of safe and effective pain therapeutics: challenges and opportunities. **Nat Rev Neurol** [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2025 May 25];16(7):381–400. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41582-020-0362-2>

Deeks JJ, Altman DG. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. **BMJ** [Internet]. 2004 Jul 17 [cited 2025 May 23];329(7458):168. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC478236/>

Delacour H, Sauvanet C, Ceppa F, Burnat P. Analytical performances of the Diazyme ADA assay on the Cobas® 6000 system. **Clin Biochem** [Internet]. 2010 Dec [cited 2025 May 16];43(18):1468–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20850428/>

DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. **Biometrics** [Internet]. 1988 [cited 2025 May 16];44(3):837–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3203132/>

Dong Z, Chen Q, Zhao D, Zhang S, Yu K, Wang G, et al. Utilizing saliva metabolomics for diagnosing gastric cancer and exploring the changes in saliva metabolites after surgery. **Onco Targets Ther** [Internet]. 2024 [cited 2025 Jun 3];17:933–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39530041/>

Dubba MR, Ramyashree V, Harshitha SS, Biswas M, Shenoy RP, Suryakanth VB. Efficiency of Galanti and Guisti method of ADA estimation in comparison with the gold standard. **Ethiop J Health Sci** [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2025 May 16];30(6):897. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8047241/>

Eddy DM, Hollingworth W, Caro JJ, Tsevat J, McDonald KM, Wong JB. Model transparency and validation: A report of the ISPOR-SMDM modeling good research practices task force-7. **Med Decis Making** [Internet]. 2012 Sep [cited 2025 May 18];32(5):733–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22990088/>

Eftimiou O, Seo M, Chalkou K, Debray T, Egger M, Salanti G. Developing clinical prediction models: a step-by-step guide. **BMJ** [Internet]. 2024 Sep 3 [cited 2025 Jun 8];386:e078276. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39227063/>

Elkhwagy DMAS, Kiriacos CJ, Mansour M. Logistic regression and other statistical tools in diagnostic biomarker studies. **Clin Transl Oncol** [Internet]. 2024 Sep 1 [cited 2025 May 23];26(9):2172–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38530558/>

Evans PT, Zhang RS, Cao Y, Breslin S, Panebianco N, Baston CM, et al. The use of thoracic ultrasound to predict transudative and exudative pleural effusion. **POCUS J** [Internet]. 2021 Nov 23 [cited 2025 May 1];6(2):97. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9979869/>

Eze NJ, Nwagboso C, Ogbudu S, Chidiebere E, Bassey O, Etiuma A. Diagnostic role of video-assisted thoracoscopy in the management of indeterminate pleural effusion. **Niger J Clin Pract** [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2025 May 16];25(12):1978–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36537454/>

Feller-Kopman D, Light R. Pleural disease. Ingelfinger JR, editor. **N Engl J Med** [Internet]. 2018 Feb 22 [cited 2025 Apr 25];378(8):740–51. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1403503>

Ferguson CJ. An effect size primer: a guide for clinicians and researchers. **Prof Psychol Res Pract**. 2009;40(5):532–8.

Ferreiro L, Toubes ME, Suárez-Antelo J, Rodríguez-Núñez N, Valdés L. Clinical overview of the physiology and pathophysiology of pleural fluid movement: a narrative review. **ERJ Open Res** [Internet]. 2024 Sep 6 [cited 2025 Apr 29];10(5):00050–2024. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39351376/>

Fischer GB. Pleural effusions in children from Southern Brazil. **Pediatr Respir Rev** [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2025 Jun 15];17:48–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1526054215000822>

Food and Drug Administration (US); National Institutes of Health (US). **BEST (Biomarkers, Endpoints, and other Tools) Resource** [Internet]. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); 2016 [cited 2025 May 23]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27010052/>

Glas AS, Lijmer JG, Prins MH, Bossel GJ, Bossuyt PMM. The diagnostic odds ratio: A single indicator of test performance. **J Clin Epidemiol** [Internet]. 2003 [cited 2025 May 23];56(11):1129–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14615004/>

Habibzadeh F, Habibzadeh P. The likelihood ratio and its graphical representation. **Biochem Med (Zagreb)** [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2025 Jul 25];29(2):020101. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6457916/>

Hassanzad M, Hajian-Tilaki K. Methods of determining optimal cut-point of diagnostic biomarkers with application of clinical data in ROC analysis: an update review. **BMC Med Res Methodol** [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2025 May 16];24(1):84. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11000303/>

Hooper C, Lee YCG, Maskell N. Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society pleural disease guideline 2010. **Thorax** [Internet]. 2010 [cited 2025 Apr 25];65(Suppl 2):ii4–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20696692/>

Hosmer DW, Lemeshow S, Sturdivant RX. *Applied Logistic Regression*. 3rd ed. [Internet]. Hoboken (NJ): Wiley; 2013 Aug 29 [cited 2025 May 18]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118548387>

Huang W, Yuan C, Patel KM, Mei A, Avilla K, Zhang X, et al. Transthoracic ultrasound to predict exudative pleural effusion etiology. **J Ultrasound Med** [Internet]. 2025 Aug 1 [cited 2025 Sep 16];44(8):1343–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40156237/>

Huang Y, Yin J, Samawi H. Methods improving the estimate of diagnostic odds ratio. **Commun Stat Simul Comput** [Internet]. 2018 Feb 7 [cited 2025 Aug 28];47(2):353–66. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03610918.2016.1157183>

Iba K, Shinozaki T, Maruo K, Noma H. Re-evaluation of the comparative effectiveness of bootstrap-based optimism correction methods in the development of multivariable clinical prediction models. **BMC Med Res Methodol** [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2025 Jun 3];21(1):1–14. Available from: <https://bmcmmedresmethodol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12874-020-01201-w>

Jadhav AA, Bardapurkar JS. Diagnostic value of adenosine deaminase to differentiate exudates and transudates. **Indian J Physiol Pharmacol**. 2007;51(2):170–4. PMID: 18175662.

Kiryukhina L, Dyakova M, Esmedlyeva D. Adenosine deaminase in the COPD pathogenesis in patients with pulmonary tuberculosis. **Eur Respir J** [Internet]. 2018 Nov 19 [cited 2025 May 1];52(Suppl 62):PA2718. Available from: https://publications.ersnet.org/content/erj/52/suppl_62/PA2718

Lakens D. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. **Front Psychol** [Internet]. 2013 Nov 26 [cited 2025 Jul 8];4:863. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsyg.2013.00863/full>

Le T-TT, Berg NK, Harting MT, Li X, Eltzschig HK, Yuan X. Purinergic signaling in pulmonary inflammation. **Front Immunol**. 2019;10:1633. doi:10.3389/fimmu.2019.01633. PMID: 31379836; PMCID: PMC6646739

Lee DK. Alternatives to P value: confidence interval and effect size. **Korean J Anesthesiol** [Internet]. 2016 Oct 25 [cited 2025 Jun 1];69(6):555–62. Available from: <http://ekja.org/journal/view.php?doi=10.4097/kjae.2016.69.6.555>

Leite DFB, Padilha MAS, Cecatti JG. Approaching literature review for academic purposes: The Literature Review Checklist. **Clinics (Sao Paulo)** [Internet]. 2019 [cited 2025 Aug 3];74:e1403. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6862708/>

Lenhard W, Lenhard A. Computation of effect sizes. **Psychometrika** [Internet]. 2022 [cited 2025 Jul 4]. Available from: https://www.psychometrika.de/effect_size.html. doi:10.13140/RG.2.2.17823.92329

Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball WC. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. **Ann Intern Med**. 1972;77(4):507–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4642731/>

Lin L, Li S, Xiong Q, Wang H. A retrospective study on the combined biomarkers and ratios in serum and pleural fluid to distinguish the multiple types of pleural effusion. **BMC Pulm Med** [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2025 Apr 29];21(1):1–10. Available from: <https://bmcpulmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12890-021-01459-w>

Machado T, Fonseca AJ da, Buenafuente SMF. Pleural tuberculosis in the state of Roraima, Brazil, between 2005 and 2013: quality of diagnosis. **J Bras Pneumol** [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2025 Jun 15];42(2):106–13. Available from: <https://www.scielo.br/j/jbpneu/a/s44wMfXCjkG936gRwsHTyTR/?lang=en>

Maher JM, Markey JC, Ebert-May D. The other half of the story: effect size analysis in quantitative research. **CBE Life Sci Educ** [Internet]. 2013 Sep 4 [cited 2025 Jul 2];12(3):345. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3763001/>

Maranhão BHF, da Silva CT, Chibante AM da S, Cardoso GP. Dosagem de proteínas totais e desidrogenase láctica para o diagnóstico de transudatos e exsudatos pleurais: redefinindo o critério clássico com uma nova abordagem estatística. **J Bras Pneumol** [Internet]. 2010 [cited 2025 May 1];36(4):468–74. Available from: <https://www.scielo.br/j/jbpneu/a/XBz93gdfpK37m8B5V4jBHcb/abstract/?lang=pt>

Maranhão BHF, da Silva Junior CT, Barillo JL, Souza JBS, Silva PS, Stirbulov R. Total adenosine deaminase cases as an inflammatory biomarker of pleural effusion syndrome. **World J Clin Cases** [Internet]. 2025 Jul 6 [cited 2025 Jul 23];13(19):101850. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/40620456>

Martinez-Cambor P, Perez-Fernandez S, Diaz-Couto S. Area under the ROC curve as effect size measure. **Pak J Stat.** 2020;36(1):13–28.

Matsui S, Le-Rademacher J, Mandrekar SJ. Statistical models in clinical studies. **J Thorac Oncol** [Internet]. 2021 May 1 [cited 2025 May 18];16(5):734. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8085106/>

Mehta M, Marwah S, Shah H, Trivedi A. A study of the utility of lactate dehydrogenase, total proteins, and adenosine deaminase in the diagnosis of pleural exudates: A new statistical approach. **Int J Med Sci Public Health** [Internet]. 1970 Jan 1 [cited 2025 Jul 29];4(2):286. Available from: <https://www.ijmsph.com/?mno=481>

Michael CW, Davidson B. Pre-analytical issues in effusion cytology. **Pleura Peritoneum** [Internet]. 2016 Apr 13 [cited 2025 May 16];1(1):45. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6328068/>

Mitchell AJ. Sensitivity × PPV is a recognized test called the clinical utility index (CUI+). **Eur J Epidemiol** [Internet]. 2011 Mar [cited 2025 Aug 17];26(3):251–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21442261/>

Moons KGM, Altman DG, Reitsma JB, Ioannidis JPA, Macaskill P, Steyerberg EW, et al. Transparent reporting of a multivariable prediction model for individual prognosis or diagnosis (TRIPOD): explanation and elaboration. **Ann Intern Med** [Internet]. 2015 Jan 6 [cited 2025 Jul 4];162(1):W1–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25560730/>

Negida A, Fahim NK, Negida Y. Sample size calculation guide - Part 4: How to calculate the sample size for a diagnostic test accuracy study based on sensitivity, specificity, and the area under the ROC curve. **Adv J Emerg Med** [Internet]. 2019 [cited 2025 May 16];3(3):e33. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6683590/>

Norvell DC. Study types and bias—Don't judge a study by the abstract's conclusion alone. *Evidence-Based Spine-Care Journal* [Internet]. 2010 Aug [cited 2025 May 16];1(2):7. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3623096/>

Ou FS, Michiels S, Shyr Y, Adjei AA, Oberg AL. Biomarker discovery and validation: Statistical considerations. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2025 May 18];16(4):537. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8012218/>

Phillips MR, Wykoff CC, Thabane L, Bhandari M, Chaudhary V, Sivaprasad S, et al. The clinician's guide to p values, confidence intervals, and magnitude of effects. **Eye (Lond)** [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2025 May 23];36(2):341–2. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41433>

Porcel JM, Vives M, de Vicente Vera MC, Cao G, Rubio M, Rivas MC. Useful tests on pleural fluid that distinguish transudates from exudates. **Ann Clin Biochem.** 2001;38(6):671–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11732649/>

Ranganathan P. An introduction to statistics: diagnostic tests. **Indian J Crit Care Med** [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2025 Jul 10];25(Suppl 3):S283. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9108787/>

Raslich MA, Markert RJ, Stutes SA. Selecting and interpreting diagnostic tests. **Biochem Med (Zagreb)** [Internet]. 2007 Dec 15 [cited 2025 Sep 1];17(2):151–61. Available from: <https://www.biochemia-medica.com/en/journal/17/10.11613/BM.2007.014>

Ray P, Le Manach Y, Riou B, Houle TT. Statistical evaluation of a biomarker. **Anesthesiology** [Internet]. 2010 Apr [cited 2025 May 16];112(4):1023–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20234303/>

Roberts ME, Rahman NM, Maskell NA, Bibby AC, Blyth KG, Corcoran JP, et al. British Thoracic Society Guideline for pleural disease. **Thorax** [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2025 Apr 25];78(Suppl 3):s1–42. Available from: https://thorax.bmj.com/content/78/Suppl_3/s1

Rodríguez E, Porcel Pérez JM, et al. Recommendations of diagnosis and treatment of pleural effusion. Update. **Arch Bronconeumol.** 2014;50(6):235–49.

Rowley J, Slack F. Conducting a literature review. **Manag Res News.** 2004 Jun 1;27(6):31–9.

Rutjes AWS, Reitsma JB, Coomarasamy A, Khan KS, Bossuyt PMM. Evaluation of diagnostic tests when there is no gold standard: a review of methods. **Health Technol Assess** [Internet]. 2007 [cited 2025 Aug 22];11(50). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18021577/>

Salgado JF. Transforming the area under the normal curve (AUC) into Cohen's d, Pearson's rpb, odds-ratio, and natural log odds-ratio: two conversion tables. **Eur J Psychol Assess** [Internet]. 2018 Jan 2 [cited 2025 Jul 4];10(1):35–47. Available from: <https://journals.copmadrid.org/ejpalc/art/ejpalc2018a5>

Schlattmann P. Statistics in diagnostic medicine. **Clin Chem Lab Med** [Internet]. 2022 May 1 [cited 2025 Jun 22];60(6):801–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35357790/>

Schober P, Vetter TR. Logistic regression in medical research. **Anesth Analg** [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2025 Aug 10];132(2):365. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7785709/>

Seiscento M, Vargas FS, Rujula MJP, Bombarda S, Uip DE, Galesi VMN. Epidemiological aspects of pleural tuberculosis in the state of São Paulo, Brazil (1998–2005). **J Bras Pneumol**. 2009;35(6):548–54. doi:10.1590/S1806-37132009000600008

Serdar CC, Cihan M, Yücel D, Serdar MA. Sample size, power and effect size revisited: simplified and practical approaches in pre-clinical, clinical and laboratory studies. **Biochem Med (Zagreb)** [Internet]. 2020 [cited 2025 Jul 10];31(1):010502. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7745163/>

Shi DD, Tian J, Ding J. Adenosine deaminase in pleural effusion: Bridging diagnosis and the pathophysiology of inflammation. **World J Clin Cases**. 2025;13(22):106925. doi: 10.12998/wjcc.v13.i22.106925. Available from: <https://www.wjgnet.com/2307-8960/coretip/v13/i22/106925.htm>

Silva Junior CT, Behrsin RF, Cardoso GP, de Araújo EG. Evaluation of adenosine deaminase activity for the diagnosis of pleural TB in lymphocytic pleural effusions. **Biomark Med** [Internet]. 2013 [cited 2025 May 1];7(1):113–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23387492/>

Šimundić AM. Measures of Diagnostic Accuracy: Basic Definitions. **EJIFCC** [Internet]. 2009 Jan [cited 2025 May 18];19(4):203. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4975285/>

Skaik Y. Medical literature review: Search or perish. **Pak J Med Sci** [Internet]. 2013 [cited 2025 Aug 3];29(2):680. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3809267/>

Skalská H, Freylich V. Web-bootstrap estimate of area under ROC curve. **Aust J Stat** [Internet]. 2006 [cited 2025 May 27];35(2–3):325–30. Available from: <https://doaj.org/article/9e52b5bdc4b94a5ab66a1f51baad6017>

Smithson M. The receiver operating characteristic area under the curve (or mean ridit) as an effect size. *Psychol Methods* [Internet]. 2023 Jul 13 [cited 2025 Jul 3];30(3):678–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37439716/>

Snyder H. Literature review as a research methodology: An overview and guidelines. *J Bus Res*. 2019 Nov 1;104:333–9.

Sperandei S. Understanding logistic regression analysis. *Biochem Med (Zagreb)* [Internet]. 2014 [cited 2025 Aug 8];24(1):12. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3936971/>

Steyerberg EW, Harrell FE. Prediction models need appropriate internal, internal-external, and external validation. *J Clin Epidemiol* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2025 May 25];69:245. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5578404/>

Steyerberg EW, Vickers AJ, Cook NR, Gerds T, Gonen M, Obuchowski N, et al. Assessing the performance of prediction models: a framework for some traditional and novel measures. *Epidemiology* [Internet]. 2010 Jan [cited 2025 Jun 6];21(1):128–38. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3575184/>

Steyerberg EW. *Clinical Prediction Models: A Practical Approach to Development, Validation, and Updating*. 2nd ed. Cham (CH): Springer; 2019. Available from: <https://www.amazon.com/Clinical-Prediction-Models-Development-Validation/dp/3030163989>

Sullivan GM, Feinn R. Using effect size—or why the p value is not enough. *J Grad Med Educ* [Internet]. 2012 Sep 1 [cited 2025 Jun 29];4(3):279–82. Available from: <https://doi.org/10.4300/JGME-D-12-00156.1>

Szumilas M. Explaining odds ratios. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry* [Internet]. 2010 Aug [cited 2025 Aug 28];19(3):227. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2938757/>

Unal I. Defining an optimal cut-point value in ROC analysis: an alternative approach. *Comput Math Methods Med* [Internet]. 2017 [cited 2025 Jun 22];2017:3762651. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5470053/>

Van Calster B, McLernon DJ, van Smeden M, Wynants L, Steyerberg EW, Bossuyt P, et al. Calibration: The Achilles heel of predictive analytics. *BMC Med* [Internet]. 2019 Dec 16 [cited 2025 May 26];17(1):1–7. Available from: <https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-019-1466-7>

Van den Bruel A, Aertgeerts B, Buntinx F. Results of diagnostic accuracy studies are not always validated. *J Clin Epidemiol* [Internet]. 2006 Jun 1 [cited 2025 Aug 17];59(6):559.e1–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0895435605004282>

Van Smeden M, Reitsma JB, Riley RD, Collins GS, Moons KGM. Clinical prediction models: diagnosis versus prognosis. *J Clin Epidemiol* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2025 Aug 3];132:142–5. Available from: <https://www.jclinepi.com/action/showFullText?pii=S0895435621000135>

Verbakel JY, Steyerberg EW, Uno H, de Cock B, Wynants L, Collins GS, et al. ROC curves for clinical prediction models part 1. ROC plots showed no added value above the AUC when evaluating the performance of clinical prediction models. *J Clin Epidemiol* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2025 Aug 13];126:207–16. Available from: <https://www.jclinepi.com/action/showFullText?pii=S0895435618310047>

Villena Garrido V, Cases Viedma E, Fernández Villar A, de Pablo Gafas A, Pérez Rodríguez E, Porcel Pérez JM, et al. Normativa sobre el diagnóstico y tratamiento del derrame pleural. Actualización. *Arch Bronconeumol* [Internet]. 2014 Jun [cited 2025 Nov 9];50(6):235–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24698396/>

Von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP. Strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *BMJ* [Internet]. 2007 Oct 20 [cited 2025 May 16];335(7624):806. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2034723/>

West JB. Why doesn't the elephant have a pleural space? *News Physiol Sci* [Internet]. 2002 [cited 2025 Apr 27];17(2):47–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11909991/>

Wu JC, Martin AF, Kacker RN. Monte Carlo studies of bootstrap variability in ROC analysis with data dependency. *Commun Stat Simul Comput* [Internet]. 2019 Feb 7 [cited 2025 May 18];48(2):317–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32165781/>

Xing G, Xing C. Adjusting for covariates in logistic regression models. *Genet Epidemiol* [Internet]. 2010 Nov [cited 2025 Aug 8];34(7):769. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3095974/>

Yao CW, Wu BR, Huang KY, Chen HJ. Adenosine deaminase activity in pleural effusions of lymphoma patients. *QJM* [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2025 May 1];107(11):887–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24854180/>

Ying GS, Maguire MG, Glynn RJ, Rosner B. Tutorial on biostatistics: receiver-operating characteristic (ROC) analysis for correlated eye data. *Ophthalmic Epidemiol* [Internet]. 2021 [cited 2025 Sep 3];29(2):117. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8586066/>

RESUMO

Maranhão, Bernardo Henrique Ferraz. ACURÁCIA DA ENZIMA ADENOSINA DESAMINASE COMO BIOMARCADOR PARA DIAGNOSTICAR EXSUDATOS E TRANSUDATOS PLEURAIS. (tese). São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2025.

Introdução: Um passo inicial na avaliação de pacientes com síndrome do derrame pleural (SDP) é determinar se o líquido pleural é um transudato ou um exsudato.

Objetivos: Investigar a acurácia da enzima adenosina desaminase total (ADA) como biomarcador para classificar transudatos e exsudatos pleurais. **Métodos:** Um ensaio

de ADA total em líquidos pleurais (ADA-P) foi observado utilizando um kit comercial em uma coorte de base populacional com delineamento retrospectivo. **Resultados:**

Foram coletadas 157 amostras de líquido pleural de indivíduos não tratados com SDP devido a causas diversas. A causa mais prevalente em amostras de transudato (21%, $n = 33/157$) foi insuficiência cardíaca congestiva (79%, $26/33$) e, entre amostras de exsudato (71%, $n = 124/157$), tuberculose (28,0%, $44/124$). Não houve diferença significativa na proporção de ambos os sexos entre os grupos transudato e exsudato.

Os valores medianos de P-ADA foram significativamente diferentes ($P < 0,0001$) entre exsudatos totais (18,4 U/L; IIQ, 9,85-41,4) e exsudatos sem tuberculose pleural (11,0 U/L; IIQ, 7,25-19,75) e transudatos (6,85; IIQ, 2,67-11,26). Para exsudatos, a AUC da curva ROC foi de 0,820 (IC 95%, 0,751-0,877; $P < 0,001$), com excelente discriminação. O valor de referência da ADA-P para classificar exsudatos pleurais foi maior ou igual a 22,0 U/L. Este valor foi determinado na curva ROC pelo critério que proporcionou a razão de verossimilhança positiva máxima (14,64; IC 95%, 2,11-101,9) como ponto de corte. A validação interna da AUC após 1000 reamostragens foi

avaliada com uma tolerância menor que 2%. O índice de utilidade clínica da ADA-P para o diagnóstico de exsudatos pleurais foi calculado com um valor quantitativo de CUI = 2,309, com uma interpretação qualitativa de excelente. **Conclusões:** A ADA-P é um biomarcador útil para distinguir exsudatos e transudatos pleurais, com excelente discriminação, validade interna e utilidade clínica. Como perspectiva, essas conclusões sugerem que o teste da ADA-P não é apenas confiável, mas também altamente eficaz na classificação entre exsudatos e transudatos pleurais. Consequentemente, pode servir como uma ferramenta valiosa na prática clínica, melhorando a acurácia diagnóstica e os tratamentos dos pacientes.

Palavras Chave: Derrame pleural, adenosina desaminase, exsudatos, transudatos, diagnóstico, biomarcador.

ABSTRACT

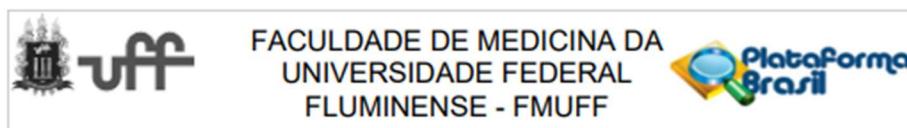
Maranhão, Bernardo Henrique Ferraz. ACCURACY OF THE ENZYME ADENOSINE DEAMINASE AS A BIOMARKER TO DIAGNOSE PLEURAL EXUDATES AND TRANSUDATES. (thesis). São Paulo: Faculty of Medical Sciences of Santa Casa de São Paulo; 2025.

Introduction: An initial step in the evaluation of pleural effusion syndrome (PES) is to determine whether the pleural fluid represents a transudate or an exudate. **Objective:** This study investigates total adenosine deaminase (ADA) as a biomarker for classifying pleural transudates and exudates. **Methods:** Total ADA in pleural fluids (P-ADA) was measured using a commercial kit in a population-based cohort with a retrospective design. **Results.** 157 pleural fluid samples were collected from untreated individuals with PES due to several causes. The cause most prevalent in transudate samples (21%, $n = 33/157$) was congestive heart failure (79%, $26/33$), and that among exudate samples (71%, $n = 124/157$) was tuberculosis (28.0%, $44/124$). There was no significant difference in the proportion of either sex between the transudate and exudate groups. The median values of P-ADA were significantly different ($P < 0.0001$) between both total exudates (18.4 U/L; IQR, 9.85-41.4) and exudates without pleural tuberculosis (11.0 U/L; IQR, 7.25-19.75) and transudates (6.85; IQR, 2.67-11.26). For exudates, the AUC from the ROC curve was 0.820 (95% CI, 0.751-0.877; $P < 0.001$), with excellent discrimination. The reference value of P-ADA to classify pleural exudates was greater than or equal to 22.0 U/L. This value was determined in the ROC curve by the criterion that provided the maximum positive likelihood ratio (14.64; 95% CI, 2.11-101.9) as the cutoff point. Internal validation of the AUC after 1000 resamples

was evaluated with a tolerance minor than 2%. The clinical utility index of the P-ADA for diagnosing pleural exudates was calculated as 2.309, which is interpreted qualitatively as excellent. **Conclusion:** P-ADA is a useful biomarker for distinguishing pleural exudates from transudates with excellent discrimination, internal validity, and clinical utility. From this perspective, these conclusions suggest that the P-ADA test is not only reliable but also highly effective in distinguishing between pleural exudates and transudates. Consequently, it may serve as a valuable tool in clinical practice, improving diagnostic accuracy and patient outcomes.

Keywords: Pleural effusion, Adenosine deaminase, Exudates, Transudates; Diagnostic; Biomarker.

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO, DISCRIMINAÇÃO E CALIBRAÇÕES POR VALIDAÇÕES INTERNA E EXTERNA, PARA UM ESTUDO COM DELINEAMENTO OBSERVACIONAL COM FINALIDADE DE ACURÁCIA DIAGNÓSTICA E MODELOS DE PREVISÃO COM ADENOSINA DESAMINASE E OUTROS BIOMARCADORES ORIUNDOS DE TORACOCENTESE E/OU CIRURGIA TORÁCICA VIDEOASSISTIDA PARA DIAGNÓSTICO DE TRANSUDATOS, EXSUDATOS, TUBERCULOSE E OUTRAS CAUSAS DE SÍNDROME DE DERRAME PLEURAL NO BRASIL

Pesquisador: CYRO TEIXEIRA DA SILVA JUNIOR

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 48946121.9.0000.5243

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.947.168

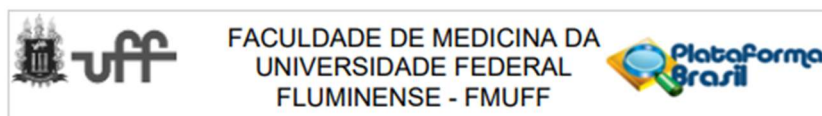
Apresentação do Projeto:

Apresentação do Projeto

O pesquisador discorre a respeito do acúmulo anormal de líquido na cavidade pleural denominado derrame pleural, ou mais precisamente, síndrome do derrame pleural (SDP). Afirmar que a formação de um derrame pleural envolve um ou mais mecanismos capazes de aumentar a entrada ou de diminuir a saída de líquido da cavidade pleural em condições fisiológicas. Os mecanismos fisiopatológicos que provocam o derrame pleural, com a intenção de diagnosticar e tratar as doenças, ainda é desconhecido. A SDP, apesar de todos avanços tecnológicos ocorridos nos últimos anos, ainda apresenta dificuldades para o diagnóstico da causa básica, principalmente, em serviços de saúde não especializados para diagnóstico de doenças torácicas. A literatura mundial relata que, atualmente, mesmo sendo o paciente exaustivamente investigado, a causa fica sem ser estabelecida entre 2% e 41% dos casos em diversas séries pesquisadas. A SDP pode ter como causa (s) diversas doenças primárias da pleura e/ou secundárias a lesões do parênquima pulmonar e/ou enfermidades sistêmicas. Portanto, o presente estudo pretende investigar se a enzima adenosina desaminase (ADA-P) e outros biomarcadores pleurais poderiam ser utilizados para fins de acurácia

Endereço: Rua Marquês de Paraná, 303 - 4º Andar (Prédio Anexo)
Bairro: Centro **CEP:** 24.033-900
UF: RJ **Município:** NITERÓI
Telefone: (21)2629-9189 **Fax:** (21)2629-9189 **E-mail:** etica.ret@id.uff.br

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.947.168

e predição diagnóstica das principais causas de síndrome de derrame pleural no Brasil, principalmente transudatos, exsudatos e tuberculose pleural.

Hipótese

Hipótese nula ou H_0 : os eventos são independentes (não há associação entre biomarcadores e causas de síndrome do derrame pleural);

Hipótese alternativa ou H_1 : os eventos não são independentes (há associação entre biomarcadores e causas de síndrome do derrame pleural). Alfa=0,05).

Desenho de estudo, Metodologia proposta e coleta de dados

Trata-se de estudo observacional retrospectivo com finalidade de predição e acurácia diagnóstica, que será realizado em 120 participantes oriundos da unidade do HUAP, Centro de diagnóstico e investigação da tuberculose Professor Mazzini Bueno – CAIT. Esse estudo cumprirá rigorosamente os métodos das diretrizes internacionais para avaliar estudos primários de acurácia diagnóstica como o STARD (Standards for the Reporting of Diagnostic Accuracy Studies); o TRIPOD para predição de diagnóstico e o STROBE para estudos observacionais.

Sobre a metodologia, (i) os dados quantitativos e qualitativos dos nossos pacientes serão resumidos em uma planilha do MS-Excel, versão 2010;

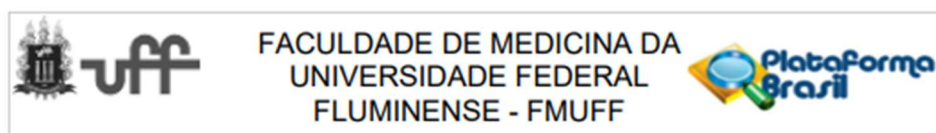
As variáveis que serão coletadas no estudo: idade, sexo, diagnóstico confirmado de transudato pleural pelo padrão áureo, diagnóstico confirmado de exsudato pleural pelo padrão áureo, dosagem de adenosina desaminase total no líquido pleural e soro, outros biomarcadores séricos e pleurais com acurácia diagnóstica para as principais causas de SDP no Brasil: glicose; DLH; proteínas totais; marcadores de colagenases, marcadores tumorais, amilase, lipase, pH (sempre avaliado em aparelho de gasometria arterial);, proteína C reativa titulada, interferon-gama, fator alfa de necrose tumoral e outras citocinas, biomarcadores de citologia pleural, histopatologia e microbiologia pleural, exames de imagem (ETUS, RM, TC e cintilografia pleural), acetilcolina e outros neurotransmissores e outras causas confirmadas de síndrome do derrame pleural de acordo com os critérios de inclusão e de diagnóstico.

(ii) serão realizados cálculos de distribuição de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk; (iii) as medidas representativas do conjunto de dados da pesquisa serão resumidas em medidas de tendência central ou medidas de centralidade. Como exemplos serão utilizadas as médias aritméticas e medianas. Como medidas de dispersão em torno da média será utilizado o desvio padrão e em torno da mediana será utilizado intervalos interquartis ou percentis a 25% e 75%; (iv)

Endereço: Rua Marquês de Paraná, 303 - 4º Andar (Prédio Anexo)
Bairro: Centro **CEP:** 24.033-900
UF: RJ **Município:** NITERÓI
Telefone: (21)2629-9189 **Fax:** (21)2629-9189 **E-mail:** etica.ret@id.uff.br

Página 02 de 08

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.947.168

como alternativa para o teste paramétrico de ANOVA será utilizado o teste de Kruskal-Wallis (K-W). O teste de comparações múltiplas de Dunn (1964) ou pós-teste de Dunn ou teste post-hoc de Dunn será utilizado após o teste de Kruskal-Wallis, se e somente se o teste de K-W permita rejeitar a hipótese nula ou H_0 ; (v) o programa denominado GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California, USA, será utilizado para os objetivos dos cálculos mencionados nos itens anteriores; (vi) os testes do Qui-quadrado ou exato de Fisher, quando apropriados, serão utilizados para comparação de proporções da variável qualitativa sexo. Esses cálculos serão realizados utilizando o programa MedCalc para Windows, versão 19.0.5, 2019 (MedCalc Software, Ostend, Belgium); (vii) a técnica não paramétrica denominada regra do trapezoido será escolhida nos softwares para construção da curva ROC. Na curva ROC a seleção do melhor valor de referência de ADA-P para classificar transudatos e exsudatos pleurais será escolhida pelo critério dos maiores valores da razão de verossimilhança positiva máxima e razão de chance para o diagnóstico – DOR (Caraguel et al., 2011). Os programas estatísticos NCSS [NCSS 11 Statistical Software (2016), NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA] e MedCalc para Windows, versão 19.0.5, 2019 (MedCalc Software, Ostend, Belgium) serão utilizados para construção da curva ROC e (viii) os seguintes parâmetros ou métodos de acurácia, com seus respectivos intervalos de confiança a 95% de probabilidade, serão utilizados para avaliar a importância clínica do biomarcador ADA-P para o diagnóstico de transudatos e exsudatos pleurais a partir do ponto de corte selecionado na curva ROC: sensibilidade, especificidade, valores preditivos, razões de verossimilhança, precisão diagnóstica, análise de risco, diagnóstico e prevalência.

As significâncias estatísticas e clínicas serão obtidas através dos valores de P bilateral de 0,05 ou menos. Os intervalos de confiança (IC) com 95% de probabilidade serão considerados para indicar significância estatística e clínica com $AUC > 0,75$ para avaliação de significância clínica. Serão realizados métodos estatísticos para discriminação e calibração dos resultados encontrados.

Amostra e cálculo da amostragem

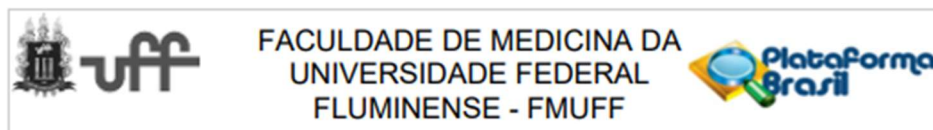
120 participantes, uniformizado em todos os documentos.

A população-alvo será constituída de indivíduos adultos com mais de 19 anos, de zona urbana, da região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro com o diagnóstico de Síndrome do Derrame Pleural e necessitando diagnóstico causal e sem procedimentos cirúrgicos e tratamento prévio para SDP. O tamanho mínimo de uma casuística para estudo de acurácia e cálculo de valor de referência será de 120 (cento e vinte) participantes divididos em dois grandes grupos: (i) casos de exsudatos (90 participantes) e (ii) controles com transudatos (30 participantes). Esse tamanho foi

Endereço: Rua Marquês de Paraná, 303 - 4º Andar (Prédio Anexo)
Bairro: Centro **CEP:** 24.033-900
UF: RJ **Município:** NITERÓI
Telefone: (21)2629-9189 **Fax:** (21)2629-9189 **E-mail:** etica.ret@id.uff.br

Página 03 de 08

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.947.168

calculado por programas de computação para cálculo de valores de referência para biomarcadores em amostras com distribuição não normal e pelas Diretrizes atualizadas do Painel de Especialistas em Teoria da Referência e Valores da Federação Internacional de Química Clínica e Medicina Laboratorial (IFCC), e recentemente publicada sob os auspícios da IFCC e da Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais – CLSI.

Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão serão a realização de exames para comprovação da causa de síndrome do derrame pleural e padrão áureo para diagnóstico de transudatos e exsudatos pleurais em participantes adultos de ambos os sexos com mais de 19 anos. O padrão áureo para o diagnóstico correlacionado com o quadro clínico do participante será através do critério brasileiro de Maranhão e Silva Junior com as dosagens de desidrogenase láctica e proteínas totais somente no líquido pleural.

Critérios de exclusão

Participantes adultos com síndrome do derrame pleural e com imunodeficiência adquirida, insuficiência renal crônica, hemotórax, terapia anticoagulante e trombolítica e aqueles em que o diagnóstico ficou indeterminado, apesar de exaustivamente investigados.

Desfecho Primário

O desfecho primário dessa pesquisa será o diagnóstico de exsudatos, transudatos, tuberculose pleural e outras causas de SDP com o biomarcador adenosina desaminase.

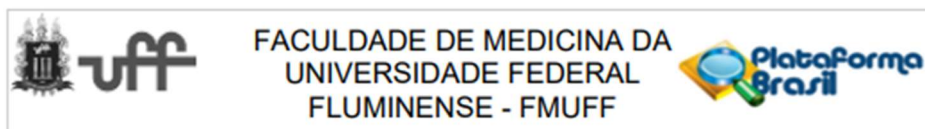
Desfecho secundário

Os desfechos secundários dessa pesquisa serão: 1) calcular o valor de referência da ADA-P em população do Estado do Rio de Janeiro para diagnosticar pacientes com derrame pleural transudativo, exsudativo e tuberculose pleural; 2) calcular os parâmetros diagnósticos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos, precisão, razões de verossimilhança e diagnostic odds ratio da ADA-P, para avaliação da sua acurácia, predição e o seu significado clínico com o valor de referência estipulado; e 3) identificar covariáveis ou variáveis independentes que serão coletadas no estudo como idade (anos), sexo feminino, sexo masculino, e biomarcadores pleurais para diagnóstico do desfecho primário.

Endereço: Rua Marquês de Paraná, 303 - 4º Andar (Prédio Anexo)
Bairro: Centro **CEP:** 24.033-900
UF: RJ **Município:** NITERÓI
Telefone: (21)2629-9189 **Fax:** (21)2629-9189 **E-mail:** etica.ret@id.uff.br

Página 04 de 08

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.947.168

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos declarados da pesquisa são:

OBJETIVO GERAL

Avaliar os níveis de ADA total (ADA-P) e outros biomarcadores em líquidos pleurais em causas diversas de síndrome do derrame pleural no Brasil.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Calcular o valor de referência da ADA-P e outros biomarcadores pleurais em população do Estado do Rio de Janeiro para diagnosticar pacientes com derrame pleural transudativo, exsudativo, tuberculose e outras causais de síndrome do derrame pleural;
- Calcular os parâmetros diagnósticos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos, acurácia preditiva, razões de verossimilhança e diagnostic odds ratio da ADA-P e outros biomarcadores pleurais para avaliação da sua acurácia, predição e significado clínico com os valores de referências estipulados para transudato, exsudato, tuberculose e outras causas de síndrome do derrame pleural.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador apresenta como riscos e benefícios:

Riscos

O risco de uma pesquisa é a possibilidade decorrente (chance, probabilidade) de danos, passível de indenização, à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano dela participante. Considerando que não há na normativa do Sistema CEP/CONEP do CNS para os riscos envolvidos em pesquisas retrospectivas com prontuários, mas também considerando que a Resolução 466/2012 traz que toda pesquisa possui riscos, classificamos como tendo riscos mínimos essa pesquisa. O risco mínimo de nossa pesquisa poderá ser a quebra de sigilo, ainda que involuntária e não intencional. É um risco possível que será reconhecido e informado ao participante no TCLE. Para minimizar esse risco o banco de dados eletrônico consultado somente estará disponível com senha de conhecimento do pesquisador responsável pelo projeto e na planilha para estatística somente constará o número do prontuário do paciente e nunca seus dados pessoais.

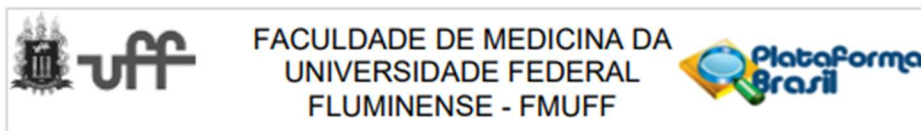
Benefícios:

Não haverá benefício direto para os participantes da pesquisa. Se os objetivos e as conclusões do projeto de pesquisa atual forem validados, a dosagem da ADA-P e outros biomarcadores pleurais

Endereço: Rua Marquês de Paraná, 303 - 4º Andar (Prédio Anexo)
 Bairro: Centro CEP: 24.033-900
 UF: RJ Município: NITERÓI
 Telefone: (21)2629-9189 Fax: (21)2629-9189 E-mail: etica.ret@id.uff.br

Página 05 de 08

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.947.168

servirão para dois grandes benefícios indiretos para os participantes da pesquisa: 1) diagnóstico rápido e não invasivo de transudatos, exudatos, tuberculose e outras doenças pleurais através de biomarcadores. 2) diagnósticos das principais causas de síndrome de derrame pleural com valores de referências no Brasil.

Avaliação do binômio risco-benefício

Favorável

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta de pesquisa apresentada é relevante uma vez que pretende investigar se a enzima adenosina desaminase (ADA-P) podem ser utilizados para fins de acurácia e predição diagnóstica das principais causas de síndrome de derrame pleural no Brasil, principalmente transudatos, exudatos e tuberculose pleural. Trata-se de retorno de pendências do último parecer de número 4.930.326.

Pendência 1: Apresentar termo de comprometimento

Resposta do pesquisador: Anexado termo de comprometimento do pesquisador responsável

Situação: Pendência atendida

Pendência 2: Apresentar carta de anuência da Gerência de Ensino e Pesquisa do HUAP/EBSERH.

Resposta do pesquisador: "O projeto será realizado com participantes do banco de dados do Centro de Atenção e Investigação da Tuberculose e outras Doenças Pulmonares Prof. Mazzini Bueno (CAIT) da Universidade Federal Fluminense (UFF), entre os períodos de Janeiro de 2015 a Dezembro de 2019. Cabe observar que o CAIT está vinculado, no cronograma da UFF, ao diretor da Faculdade de Medicina e não ao diretor do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP). O CAIT é um centro de pesquisa, ensino e assistência da UFF que possui chefia própria. Assim, não está subordinado a Gerência de Ensino e Pesquisa do HUAP/EBSERH". Carta de anuência já anexada.

Situação: Pendência atendida

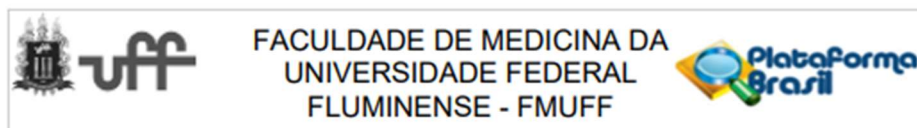
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sobre os termos de apresentação obrigatória, foram apresentados os documentos:

Endereço: Rua Marquês de Paraná, 303 - 4º Andar (Prédio Anexo)
 Bairro: Centro CEP: 24.033-900
 UF: RJ Município: NITERÓI
 Telefone: (21)2629-9189 Fax: (21)2629-9189 E-mail: etica.ret@id.uff.br

Página 06 de 08

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.947.168

1. A Folha de rosto está devidamente assinada e carimbada pela autoridade institucional e o tamanho da amostra está de acordo em todos os documentos apresentados.
2. A Carta de anuência do Centro de diagnóstico e investigação da tuberculose Professor Mazzini Bueno – CAIT está em papel timbrado da Instituição. Está assinada e carimbada com identificação correta da autoridade.
3. A equipe cadastrada na Plataforma Brasil apresenta o registro de todos os membros da equipe.
4. O pesquisador apresentou termo comprometendo-se a inserir os resultados da pesquisa na Plataforma Brasil.
5. O cronograma apresentado está adequado. Segundo resolução CNS nº 466 de 2012, item XI.2.a e Norma operacional CNS nº 001 de 2013, item 3.4.9.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Visto que as pendências contidas no último parecer consubstanciado foram devidamente atendidas e não há agravo ético aparente aos participantes desta pesquisa, este CEP entende que este projeto deva ser APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo APROVADO.

Observações:

- a cada 6 (seis) meses após a aprovação do projeto, deverão ser encaminhados relatórios parciais, através de Notificação na Plataforma Brasil, visando seu acompanhamento.
- o Relatório Final deve ser encaminhado após o encerramento do estudo, conforme instruções disponíveis na página do CEP.
- Caso o pesquisador precise fazer Emenda ao Projeto, é obrigatório o envio antecipado de Relatório Parcial via Notificação. A Emenda só poderá ser solicitada após aprovação da Notificação com relatório parcial.

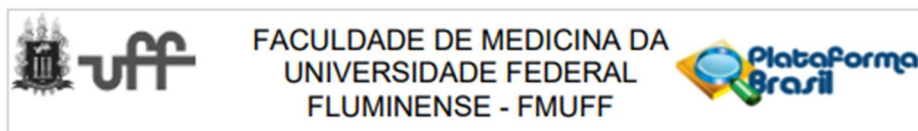
Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Rua Marquês de Paraná, 303 - 4º Andar (Prédio Anexo)
 Bairro: Centro CEP: 24.033-900
 UF: RJ Município: NITEROI
 Telefone: (21)2629-9189 Fax: (21)2629-9189 E-mail: etica.ret@id.uff.br

Página 07 de 08

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.947.168

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1787946.pdf	27/08/2021 14:50:41		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	PlataformaBrasilTCLEParecer4930326.pdf	27/08/2021 14:50:09	CYRO TEIXEIRA DA SILVA JUNIOR	Aceito
Declaração de Pesquisadores	PlataformaBrasilTermodeComprometimentoParecer4930326.pdf	27/08/2021 14:36:28	CYRO TEIXEIRA DA SILVA JUNIOR	Aceito
Outros	PlataformaBrasilCartaCEPParecer4930326.pdf	27/08/2021 14:34:30	CYRO TEIXEIRA DA SILVA JUNIOR	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PlataformaBrasilProjetoPesquisaParecer4930326.docx	27/08/2021 14:27:42	CYRO TEIXEIRA DA SILVA JUNIOR	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	PlataformaBrasilCartadeanuenciaCAITU FF.pdf	05/08/2021 10:46:42	CYRO TEIXEIRA DA SILVA JUNIOR	Aceito
Folha de Rosto	PlataformaBrasilFolhaRosto05072021.pdf	05/07/2021 10:02:48	CYRO TEIXEIRA DA SILVA JUNIOR	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

NITEROI, 01 de Setembro de 2021

Assinado por:
LUIS GUILLERMO COCA VELARDE
 (Coordenador(a))

Endereço: Rua Marquês de Paraná, 303 - 4º Andar (Prédio Anexo)
 Bairro: Centro CEP: 24.033-900
 UF: RJ Município: NITEROI
 Telefone: (21)2629-9189 Fax: (21)2629-9189 E-mail: etica.ret@id.uff.br

Página 08 de 08

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Acurácia da enzima adenosina desaminase como biomarcador para diagnosticar exsudatos e transudatos pleurais

Pesquisador Responsável: Cyro Teixeira da Silva Junior

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Universidade Federal Fluminense

Telefones e e-mail para contato do Pesquisador: (21) 27179485 (21) 26201362; ctsilvajunior@predialnet.com.br

Nome do Participante:

O (A) Sr.(ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa "Acurácia da enzima adenosina desaminase como biomarcador para diagnosticar exsudatos e transudatos pleurais", de responsabilidade do pesquisador Cyro Teixeira da Silva Junior. Justifica-se tal pesquisa para descobrir a doença que está causando a "água na pleura" ou derrame pleural do paciente. O objetivo geral da pesquisa será avaliar os níveis de um exame denominado ADA total em líquidos pleurais de causas diversas de síndrome do derrame pleural. Os procedimentos realizados serão entrevistas dos pacientes e exames tais como radiografia de tórax, ultrassonografia e raramente tomografia computadorizada de tórax. Não será gravada a entrevista e nem será realizada imagem dos pacientes. O risco mínimo de nossa pesquisa poderá ser a quebra de sigilo, ainda que involuntária e não intencional. É um risco possível que será reconhecido e informado ao participante. Para minimizar esse risco o banco de dados eletrônico consultado somente estará disponível com senha de conhecimento do pesquisador responsável pelo projeto e na planilha para estatística somente constará o número do prontuário do paciente e nunca seus dados pessoais. Se os objetivos e as conclusões do projeto de pesquisa atual forem validados, a dosagem da ADA servirá para dois grandes benefícios: 1) diagnóstico rápido e não invasivo da tuberculose pleural através do exame adenosina desaminase e, 2) classificação ou diagnóstico de exsudato e transudato pleural com valor de referência brasileiro. A participação é voluntária e o consentimento permitido poderá ser retirado a qualquer tempo, sem prejuízos à continuidade do diagnóstico ou qualquer outra penalização. Essa pesquisa visa diagnóstico e não tratamento padronizado ou experimental. O paciente não será ressarcido financeiramente para participar da pesquisa. O participante deverá sanar eventuais dúvidas acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa pelos contatos do CEP/UFF: E.mail: etica.ret@ld.uff.br; Tel/fax: (21) 26299189.

Observação Importante ao participante: Os Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) são compostos por pessoas que trabalham para que todos os projetos de pesquisa envolvendo seres humanos sejam aprovados de acordo com as normas éticas elaboradas pelo Ministério da Saúde. A avaliação dos CEPs leva em consideração os benefícios e riscos, procurando minimizá-los e busca garantir que os

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

participantes tenham acesso a todos os direitos assegurados pelas agências regulatórias. Assim, os CEPs procuram defender a dignidade e os interesses dos participantes, incentivando sua autonomia e participação voluntária. Procure saber se este projeto foi aprovado pelo CEP desta instituição. Em caso de dúvidas, ou querendo outras informações, entre em contato com o Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense (CEP FM/UFF), por e.mail ou telefone, de segunda à sexta, das 08:00 às 17:00 horas:

Eu, sou maior de 19 anos e declaro ter sido informado e concordo em ser participante, do projeto de pesquisa acima descrito.

Niterói, ____ de _____ de _____

Nome e assinatura do participante:

Nome e assinatura do responsável por obter o consentimento:

Nomes e assinaturas das testemunhas 1 e 2:

Assinatura dos pesquisadores responsáveis pelo projeto atual:

Bernardo Henrique Ferraz Maranhão

CRM-RJ

CPF:

E-mail:

Telefones para contato:

Cyro Teixeira da Silva Junior

CRM-RJ: 52 35348-1

CPF: 720 255 307-49

E-mail: ctsilvajunior@predialnet.com.br

Telefones para contato: 21-2717 9485; 21-2620 1362

ANEXO 3 – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 1



Hindawi
Disease Markers
Volume 2021, Article ID 6648535, 7 pages
<https://doi.org/10.1155/2021/6648535>



Research Article

Diagnostic Accuracy with Total Adenosine Deaminase as a Biomarker for Discriminating Pleural Transudates and Exudates in a Population-Based Cohort Study

Bernardo Henrique Ferraz Maranhão,¹ Cyro Teixeira da Silva Junior², Jorge Luiz Barillo,³ Carmem Lucia Teixeira de Castro,⁴ Joeber Bernardo Soares de Souza,³ Patricia Siqueira Silva,⁴ and Roberto Stirbulov⁵

¹Department of Specialized Medicine, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Brazil

²Department of Clinics, School of Medicine, Pleurology Teaching and Research Laboratory from Professor Mazzini Bueno Tuberculosis Research and Assistance Center, Fluminense Federal University, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

³General Hospital Santa Teresa, Petropolis, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Professor Mazzini Bueno Tuberculosis Research and Assistance Center, Fluminense Federal University, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

⁵Department of Clinics, Faculty of Medical Sciences, Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence should be addressed to Cyro Teixeira da Silva Junior; ctsilvajunior@predialnet.com.br

Received 10 October 2020; Revised 23 February 2021; Accepted 5 March 2021; Published 12 April 2021

Academic Editor: Paulina Dumnicka

Copyright © 2021 Bernardo Henrique Ferraz Maranhão et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. An initial step in the evaluation of patients with pleural effusion syndrome (PES) is to determine whether the pleural fluid is a transudate or an exudate. **Objectives.** To investigate total adenosine deaminase (ADA) as a biomarker to classify pleural transudates and exudates. **Methods.** An assay of total ADA in pleural fluids (P-ADA) was observed using a commercial kit in a population-based cohort study. **Results.** 157 pleural fluid samples were collected from untreated individuals with PES due to several causes. The cause most prevalent in transudate samples (21%, $n = 33/157$) was congestive heart failure (79%, 26/33) and that among exudate samples (71%, $n = 124/157$) was tuberculosis (28.0%, 44/124). There was no significant difference in the proportion of either sex between the transudate and exudate groups. The median values of P-ADA were significantly different ($P < 0.0001$) between both total exudates (18.4 U/L; IQR, 9.85–41.4) and exudates without pleural tuberculosis (11.0 U/L; IQR, 7.25–19.75) and transudates (6.85; IQR, 2.67–11.26). For exudates, the AUC was 0.820 (95% CI, 0.751–0.877; $P < 0.001$), with excellent discrimination. The optimum cut-off point in the ROC curve was determined as the level that provided the maximum positive likelihood ratio (PLR; 14.64; 95% CI, 2.11–101.9) and was 22.0 U/L. For transudates, the AUC was 0.8245 (95% CI, 0.7470–0.9020; $P < 0.0001$). Internal validation of the AUC after 1000 resamples was evaluated with a tolerance minor than 2%. The clinical utility was equal to 92% (95% CI, 0.84 to 0.96, $P < 0.05$). **Conclusions.** P-ADA is a useful biomarker for distinguishing pleural exudates from transudates.

1. Background

Pleural effusion syndrome (PES) is determined by the interaction of dynamic phenomena that affect systemic and pulmonary circulation, lymphatic drainage, and the movements of the chest wall in many thoracic and extrathoracic diseases. Hence, the causes of PES are multiple. Therefore, based on

pathophysiology, pleural effusion is traditionally classified into two types: transudate and exudate [1–3].

A diagnosis of transudate indicates that a disease has altered the systemic or pulmonary and oncotic pressures such that the balance between the formation and resorption of pleural fluid is disrupted. Unlike transudates, exudates arise from diseases or disorders in pleural membranes that

ANEXO 3 – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 1

2

Disease Markers

increase capillary wall permeability or vascular disruption, such as infection, inflammation, infarction, and local and systemic cancer with metastasis to the pleura. Therefore, an initial step in the evaluation of patients with PES is to determine whether the pleural fluid from a thoracentesis is a transudate or an exudate [3, 4]. Light's criteria are typically employed [5]. Maranhão and Silva Junior's criterion can also be used; it has shown a diagnostic yield comparable to that of the classical Light's criteria but requires only total pleural proteins and lactate dehydrogenase in pleural fluid, without the need for serum sampling [3, 5–7]. Additional alternative criteria have been proposed in the literature [8–14]. However, ideal biomarkers in pleural fluid or serum to diagnose transudates and exudates are not yet available.

Total adenosine deaminase (ADA, adenosine aminohydrolase, enzyme code: 3.5.4.4) in pleural fluid (P-ADA) is an accurate biomarker of tuberculosis independent of human immunodeficiency virus serology status. This observation has been repeated in textbooks, reference books, and papers in recent years. While the above observation is true, the designation of total ADA as a "pleural tuberculosis biomarker" is an oversimplification [15]. ADA plays an important, active role in modulating the immune and inflammatory systems within the pleural cavity in the presence of exudative fluid [16]. The aim of the present research was to investigate total ADA as an index test or diagnostic biomarker for classifying pleural transudates and exudates.

2. Methods

2.1. Guidelines, Design, Study Population, Selection Criteria, and Sample Size. The Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Studies (STARD) and The Strengthening of Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statements were consulted to improve the quality of our study of diagnostic accuracy [17, 18]. The present research was a purely observational study with a retrospective cohort conducted from March 2015 to December 2019 at two teaching hospitals in the state of Rio de Janeiro, Brazil. The CEP CMM/HUAP Ethics Committee approved this study, which was conducted according to the guidelines of the Helsinki Declaration, under number 80/02. We obtain informed consent for this research from all patients. Pleural fluid samples were collected from continuous untreated individuals with PES due to various causes. The diagnosis of the cause of PES was confirmed by standard examinations and the use of appropriate surgical procedures [4]. Standard examinations were clinical history, physical examination, chest radiograph, and pleural ultrasound. If necessary, further image investigations were computerized tomography, positron emission tomography, and magnetic resonance imaging [4]. The classification of a transudate or exudate was established by clinical judgment and assays of total protein and total lactate dehydrogenase in pleural fluids [3, 6]. The causal diagnosis of PES was confirmed after one or two thoracentesis procedures with standard laboratory evaluation of the pleural fluid with appearance, odor, cytological analysis, and constituent assays (total proteins, lactate dehydrogenase, glucose, pH, amylase, triglycerides and cholesterol, and

natriuretic peptides), biomarkers for connective tissue diseases, bacterial pleural infections, and tuberculous pleurisy. If the PES persisted without a causal diagnosis, the patient was forwarded for video-assisted thoracoscopic surgery with an indication of pleural biopsy for histopathological diagnosis [4]. Exclusion criteria included contraindications or refusal for surgical procedures, the use of immunosuppressive drugs, hemolysis in pleural liquids, renal failure, human immunodeficiency virus infection, and PES of unknown cause. In addition, patients with serum levels of bilirubin greater than 65 mg/dL, lipid greater than 1500 mg/dL, and rheumatoid factor content greater than 1500 IU/M were excluded because these biochemical factors interfere with P-ADA [19]. According to the exclusion and inclusion criteria and the calculated minimum sample size, one hundred fifty-seven pleural fluids from 157 patients with PES with various confirmed diagnoses were selected for this study [17].

2.2. ADA Assay. Pleural fluid ADA activity was evaluated using the Diazyme Assay (Diazyme Laboratories, San Diego (CA), United States). ADA irreversibly catalyzes the conversion of adenosine (or deoxyadenosine) to inosine (or deoxyinosine) and ammonia. The classical method of Giusti and Galanti is not easily automated because the ammonia is measured with Berthelot's reaction. Hopkinson et al. (1969) described an enzyme assay for ADA determination based on nucleoside phosphorylase (NP) and xanthine oxidase (XOD). The quantification of ADA was based on the measurement of uric acid after enzymatic reactions with NP, XOD, inosine, and other reagents. Briefly, the Diazyme ADA Assay uses a kinetic method. It is based on the enzymatic deamination of adenosine to inosine which is converted to hypoxanthine by NP. Hypoxanthine is then converted to uric acid and hydrogen peroxide by XO. One unit of total ADA was defined as the amount of the enzyme that generates one micromol of inosine per min at 37°C from the substrate adenosine [19]. P-ADA assay was performed independently of the proven diagnosis of the patient in a hospital with the same health professional and conducted according to the manufacturer's guidelines.

2.3. Statistical Model Development. All quantitative and qualitative data from our patient charts were compiled in MS-Excel 2010 version 2010. Descriptive and inferential statistical analyses were performed using GraphPad (GraphPad Software, Inc., version 6.0, La Jolla, CA, USA). Laboratory data were analyzed with univariate statistical tests. A *P* value less than 0.05 determined from a two-tailed test was considered indicative of statistical significance, leading us to reject the null hypothesis with a 5% probability of a type I error. The Shapiro and Wilk test was used to evaluate the data distributions. Quantitative variables that were normally distributed were expressed as means and standard deviations, and those with nonnormal distributions were expressed in terms of their medians and interquartile range (IQR, 25th and 75th percentiles). Proportions were used to express qualitative or categorical variables. To compare proportions, a Chi-square test was employed. The Mann-Whitney *U* nonparametric test was used to compare the median of pleural total ADA

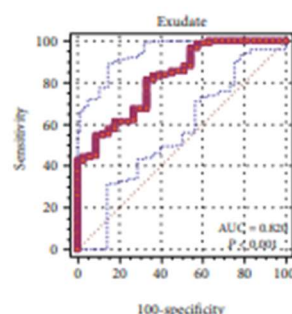
ANEXO 3 – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 1

4

Disease Markers

TABLE 2: Demographic characteristics and pleural adenosine deaminase levels in 157 cases of exudates and transudates.

Variable	Exudate (n = 124)	Transudate (n = 33)	P value
Age, years, median (IQR)	58. (41.5-73.5)	76.0 (63.0-86.25)	0.0001
Male, n (%)	58 (47.0)	16 (48.0)	
Female, n (%)	66 (53.0)	17 (52.0)	
P-ADA, U/L, median (IQR)	18.4 (9.25-41.4)	6.85 (2.67-11.26)	0.0001
P-ADA, U/L, without pleural TB, median (IQR)	11.0 (7.25-19.75)	6.85 (2.67-11.26)	0.0001

*Shapiro-Wilk normality test: $P < 0.05$; Abbreviations: IQR: interquartile range of 75%-25%; P-ADA: pleural adenosine deaminase; TB: tuberculosis.FIGURE 1: ROC curve of pleural fluid values and 95% CIs of adenosine deaminase for the diagnosis of exudates. The optimum cut-off point in ROC curve space was determined as the level that provided the maximum positive likelihood and was 22.0 U/L. AUC = 0.820 (95% CI, 0.751-0.877; $Z = 8.157$; SE, 0.0393; $P < 0.001$). Abbreviations: CIs: confidence intervals; AUC: area under the ROC curve; SE: standard error.

4. Discussion

In a diagnostic accuracy study, the results from an index test are compared with the results obtained with the reference standard on the same subjects. However, before a biomarker to be recommended for clinical practice, it should be evaluated for analytical, clinical, and internal validity. Moreover, external validation and clinical utility are desirable [28, 31, 32].

Analytical validity is performed under rigorous laboratory control and encompasses tests of sensitivity, specificity, trueness, bias (precision, repeatability), reproducibility, detection and quantification limits, linearity, range, and robustness [31]. The correlation of Diazyme ADA commercial kit with the classical Giusti method was 0.93 according to Delacour et al. [19].

Clinical validity is evaluated in diagnostic accuracy studies and refers to a test's accuracy in discriminating between subjects with or without a disease. A difficulty encountered in accuracy studies is deciding how to estimate an optimal threshold for a biomarker. An ideal cut-off point should be determined for each region and each disease evaluation. It is not a universal number [20-26].

Bossuyt et al. [28] defined the clinical utility of a biomarker or diagnostic test as "the degree to which actual use

of the corresponding test in healthcare is associated with changing health outcomes, such as preventing death and restoring or maintaining health." In other words, clinical utility refers to whether the biomarker or test can be used for a specific diagnosis or whether it is suitable for diagnostic purposes. Randomized controlled trials (RCTs) are the best context for evaluating the clinical utility of a biomarker [28, 31]. However, RCTs are rarely conducted, due to economic and ethical reasons. Furthermore, an RCT is not always necessary to evaluate a diagnostic test.

Asberg et al. [29] proposed a new index of clinical utility (CUI). We calculated a CUI for this accuracy model of 92% using the formula recommended by authors with the treatment threshold of Pauker and Kassirer [30]. The 95% confidence interval extended from 0.8479 to 0.9610 ($P < 0.05$).

Tuberculosis is the most prevalent cause of exudative pleural effusions in Brazil according to Table 1 and another paper recently published by our group [33]. Furthermore, the sex ratio and median patient age in our study were similar to those in a Brazilian sample population from a metropolitan region in the state of Rio de Janeiro, as shown in Table 2 [33]. Female sex was more prevalent than male sex in exudates and transudates, although the differences were not significant, as determined by Chi-square test (Table 2). There was a significant difference between the age of patients with exudate and transudate in Table 2 ($P < 0.0001$, Mann-Whitney test). Perhaps, the causes of transudates mentioned in Table 1 were important for the results.

The median values of total P-ADA activity in the pleural fluid of patients with exudates and transudates were 18.4 U/L and 6.85 U/L, respectively, with a highly significant P value ($P = 0.0001$) as determined by Mann-Whitney test (Table 2).

Although P-ADA has been identified as the most accurate biomarker available for pleural tuberculosis in clinical practice, we found that total P-ADA discriminated between transudates and exudates even when the tuberculosis samples were excluded ($U = 665.5$, $P < 0.0001$), as shown in Table 2.

ROC curve space can be used to identify optimal cut-off values for a given biomarker in discriminating between patient states, traditionally referred to as diseased and no diseased [22]. The ROC curve for exudates is shown in Figure 1. The ROC curve for transudates is not shown. The AUC calculated for exudates was 0.820 (95% CI, 0.751-0.877; $P < 0.001$) and that calculated for transudates was 0.8245 (95% CI, 0.7470-0.9020; $P < 0.0001$). According to the classification of Hosmer and Lemeshow, an AUC equal of 0.820 is indicative of excellent discrimination (0.80-0.90). In practice, AUCs greater than 0.90 are uncommon [26]. A 95% CI from

ANEXO 3 – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 1

Disease Markers

5

TABLE 3: Measures of diagnostic accuracy of adenosine deaminase assay following selection of the best cut-off point for pleural exudates and transudates according to the maximum positive likelihood ratio in the ROC curve space.

Diagnostic parameter, % (95% CI)	Exudate (n = 124)	Transudate (n = 33)
Best cut-off (U/L)	≥22.0	<22.0
Sensitivity	44.35 (35.4-53.5)	96.88 (83.78-99.92)
Specificity	96.98 (83.0-99.0)	42.92 (34.01-52.29)
Positive predictive value	98.11 (88.0-99.0)	29.83 (26.48-33.42)
Negative predictive value	31.0 (27.0-34.0)	98.27 (89.06-99.75)
Positive likelihood ratio	14.64 (2.11-101.9)	1.7 (1.44-2.01)
Negative likelihood ratio	0.57 (0.50-0.70)	0.07 (0.01-0.49)
Diagnostic odds ratio	23.26 (3.08-176.75)	24.28 (144.0-4.10)
Predictive accuracy	54.25 (46.0-62.0)	53.77 (45.57-61.83)
Disease prevalence	79.0	21.0

None of the 95% confidence intervals (CIs) overlap 1 (percentages) or 0 (absolute values), indicating the differences are significant at $P < 0.05$.

TABLE 4: Calibration with internal validation by bootstrapping of the 95% confidence interval of the area under the ROC curve after 1000 resamples for the classification of pleural exudate and transudate with total adenosine deaminase.

95% CI	Development AUC		Internal validation for optimism-correct AUC (95% CI)		Variation %	Chi-squared test P value
	Observed	Expected	Expected	Expected		
Minimum	0.751		0.736		-1.99	0.092 ($P = 0.7612$)
Maximum	0.877		0.883		+ 0.68	0.027 ($P = 0.8703$)

A tolerance 2% with 1000 replications was considered appropriate. Abbreviations: 95% CI: 95% confidence interval; AUC: area under the ROC curve.

AUC of 0.736 and 0.889 was obtained after 1000 resamples, and a tolerance less than 0.02 was calculated (Table 4).

A few previous have investigated the utility of P-ADA for the diagnosis of transudates and exudates. Similar to our work, they all obtained AUCs indicating excellent or very good discrimination [34–36]. The AUC space reflects the predictive performance of a biomarker. A large advantage of the ROC curve method is that the AUC space is agnostic. However, the choice of a cut-off threshold should not be, as it is dependent on several statistical and clinical criteria [20, 22, 37].

The likelihood ratio can serve as a powerful measure of the diagnostic accuracy of a biomarker [3, 26]. The PLR is the ratio of the probability of a positive test result given the presence of the disease to the probability of a positive test result given the absence of the disease. The choice of our cut-off point in ROC curve space according to the maximum positive likelihood of P-ADA for the detection of exudates demanded high specificity even at the expense of lower sensitivity (Table 3). A maximum PLR of 14.64 for exudates in our study corresponded to a cut-off point of 22.0 U/L of P-ADA and has the potential to alter clinical decisions [22, 25]. As evident from the transudate results in Table 3, with a PLR of 1.7 and a low specificity of 42%, a P-ADA level of 22.0 U/L is very useful for classifying exudates but not transudates.

The diagnostic accuracy of the traditional approach (Light's criteria) and ADA criterion in the present research were compared. A paper from our group was used [6]. For exudates, Light's criteria were 94%. In Table 3, predictive ADA criterion was 54%. However, the PLR from traditional criterion was 3.17. In Table 3, the PLR was 14.64 with ADA

criterion. Currently, the likelihood ratio is the best measure of the diagnostic accuracy of a biomarker [3, 26].

In Bhopal, India, without using the ROC curve method, Jadhav and Bardapurkar also selected a cut-off point of 22.0 U/L of P-ADA for the diagnosis of exudates. A PLR for accuracy was not calculated by the authors [35].

The present research has limitations. First, the results must be interpreted in consideration of the several criteria proposed in the literature for selecting an optimal cut-off point of a biomarker in ROC curve space. Second, our cut-off value for diagnosis of pleural exudate and transudate must be applied to a sample population similar in demographic characteristics, prevalence of PES causes, and P-ADA assay method. Third, no universal cut-off value exists for a diagnostic biomarker. Despite these limitations, we are optimistic about the future perspectives of our study. Total P-ADA is an accurate biomarker of pleural tuberculosis. Thus, the same biomarker can be used for two different purposes, although with different cut-off points: diagnosis of pleural tuberculosis and classification of transudates and exudates.

5. Conclusions

The results demonstrate that P-ADA is a useful biomarker to differentiate exudates from transudates. However, several other criteria mentioned in the literature also must be considered for clinical decision-making.

Abbreviations

ADA: Total adenosine deaminase
AUC: Area under the ROC curve

ANEXO 3 – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 1

6

Disease Markers

CI: Confidence interval
 CUI: Index of clinical utility
 IQR: Interquartile range
 NLR: Negative likelihood ratio
 P-ADA: Total ADA in pleural fluids
 PES: Pleural effusion syndrome
 PLR: Positive likelihood ratio
 RCTs: Randomized controlled trials
 ROC curve: Receiver operating characteristic curve
 STARD: The Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Studies

Data Availability

The Tables and Figure data used to support the findings of this study are included within the article.

Disclosure

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- [1] A. Eleni, "Pleural transport physiology: insights from biological marker measurements in transudates," *Open Respiratory Medicine Journal*, vol. 5, no. 1, pp. 70–72, 2011.
- [2] S. J. Lai-Fook, "Pleural mechanics and fluid exchange," *Physiological Reviews*, vol. 84, no. 2, pp. 385–410, 2004.
- [3] J. M. Porcel, J. M. Peña, C. Vicente de Vera, A. Esquerda, M. Vives, and R. W. Light, "Bayesian analysis using continuous likelihood ratios for identifying pleural exudates," *Respiratory Medicine*, vol. 100, no. 11, pp. 1960–1965, 2006.
- [4] C. Hooper, Y. C. G. Lee, and N. Maskell, "Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society pleural disease guideline 2010," *Thorax*, vol. 65, Suppl 2, pp. ii4–ii17, 2010.
- [5] R. W. Light, M. I. Macgregor, P. C. Luchsinger, and W. C. Ball, "Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates," *Annals of Internal Medicine*, vol. 77, no. 4, pp. 507–513, 1972.
- [6] B. H. F. Maranhão, C. T. Silva Junior, A. M. S. Chibante, and G. P. Cardoso, "Determination of total proteins and lactate dehydrogenase for the diagnosis of pleural transudates and exudates: Redefining the classical criterion with a new statistical approach," *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, vol. 36, no. 4, pp. 468–474, 2010.
- [7] L. Valdés, M. E. San José, A. Pose et al., "Diagnosing tuberculous pleural effusion using clinical data and pleural fluid analysis: A study of patients less than 40 years-old in an area with a high incidence of tuberculosis," *Respiratory Medicine*, vol. 104, no. 8, pp. 1211–1217, 2010.
- [8] M. G. Alexandrakis, D. Kyriakou, R. Alexandraki, K. A. Pappa, N. Antonakis, and D. Bouros, "Pleural Interleukin-1 β in differentiating transudates and exudates: comparative analysis with other biochemical parameters," *Respiration*, vol. 69, no. 3, pp. 201–206, 2002.
- [9] E. Garcia-Pachon, I. Padilla-Navas, J. F. Sanchez, B. Jimenez, and J. Custardoy, "Pleural fluid to serum cholinesterase ratio for the separation of transudates and exudates," *Chest*, vol. 110, no. 1, pp. 97–101, 1996.
- [10] H. Hamm, U. Brohan, R. Bohmer, and H. P. Missmahl, "Cholesterol in Pleural Effusions: A Diagnostic Aid," *Chest*, vol. 92, no. 2, pp. 296–302, 1987.
- [11] S. Meisel, A. Shamiss, M. Thaler, N. Nussinovitch, and T. Rosenthal, "Pleural fluid to serum bilirubin concentration ratio for the separation of transudates from exudates," *Chest*, vol. 98, no. 1, pp. 141–144, 1990.
- [12] E. Papageorgiou, K. Kostikas, T. Kirovopoulos, E. Karetzi, G. Mpatavanis, and K. I. Gourgoulis, "Increased oxidative stress in exudative pleural effusions: a new marker for the differentiation between exudates and transudates?," *Chest*, vol. 128, no. 5, pp. 3291–3297, 2005.
- [13] B. J. Roth, T. F. O'Meara, and W. H. Cragun, "The serum-effusion albumin gradient in the evaluation of pleural effusions," *Chest*, vol. 98, no. 3, pp. 546–549, 1990.
- [14] J. Tomcsányi, E. Nagy, M. Somló et al., "NT-brain natriuretic peptide levels in pleural fluid distinguish between pleural transudates and exudates," *European Journal of Heart Failure*, vol. 6, no. 6, pp. 753–756, 2004.
- [15] J. L. Barillo, C. T. Da Silva Junior, P. S. Silva et al., "Increased cytokeratin 19 fragment levels are positively correlated with adenosine deaminase activity in malignant pleural effusions from adenocarcinomas," *Disease Markers*, vol. 2018, Article ID 2609767, 6 pages, 2018.
- [16] C. T. Da Silva, R. F. Behrsin, G. P. Cardoso, and E. G. De Araújo, "Evaluation of adenosine deaminase activity for the diagnosis of pleural TB in lymphocytic pleural effusions," *Biomarkers in Medicine*, vol. 7, no. 1, pp. 113–118, 2013.
- [17] P. M. Bossuyt, J. B. Reitsma, D. E. Bruns et al., "STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies," *Clinical Chemistry*, vol. 61, no. 12, pp. 1446–1452, 2015.
- [18] E. von Elm, D. G. Altman, M. Egger, S. J. Pocock, P. C. Gøtzsche, and J. P. Vandenbroucke, "The Strengthening of Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies," *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 85, no. 11, pp. 867–872, 2007.
- [19] H. Delacour, C. Sauvanet, F. Ceppa, and P. Burnat, "Analytical performances of the Diazyme ADA Assay on the cobas® 6000 system," *Clinical Biochemistry*, vol. 43, no. 18, pp. 1468–1471, 2010.
- [20] P. Ray, Y. Le Manach, B. Riou, and T. T. Houle, "Statistical evaluation of a biomarker," *Anesthesiology*, vol. 112, no. 4, pp. 1023–1040, 2010.
- [21] R. J. Irwin and T. C. Irwin, "A principled approach to setting optimal diagnostic thresholds: where ROC and indifference curves meet," *European Journal of Internal Medicine*, vol. 22, no. 3, pp. 230–234, 2011.
- [22] F. Habibzadeh, P. Habibzadeh, and M. Yadollahi, "On determining the most appropriate test cut-off value: the case of tests with continuous results," *Biochemia Medica*, vol. 26, no. 3, pp. 297–307, 2016.
- [23] C. E. Metz, "Basic principles of ROC analysis," *Seminars in Nuclear Medicine*, vol. 8, no. 4, pp. 283–298, 1978.
- [24] K. Hajian-Tilaki, "The choice of methods in determining the optimal cut-off value for quantitative diagnostic test evaluation,"

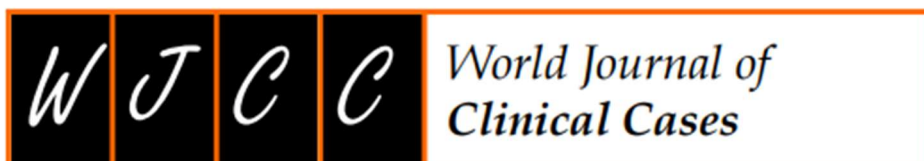
ANEXO 3 – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 1

Disease Markers

7

- Statistical Methods in Medical Research*, vol. 27, no. 8, pp. 2374–2383, 2018.
- [25] P. Eusebi, "Diagnostic accuracy measures," *Cerebrovascular Diseases*, vol. 36, no. 4, pp. 267–272, 2013.
- [26] S. R. Hayden and M. D. Brown, "Likelihood ratio: a powerful tool for incorporating the results of a diagnostic test into clinical decisionmaking," *Annals of Emergency Medicine*, vol. 33, no. 5, pp. 575–580, 1999.
- [27] J. C. Wu, A. F. Martin, and R. N. Kacker, "Monte Carlo studies of bootstrap variability in ROC analysis with data dependency," *Communications in Statistics: Simulation and Computation*, vol. 48, no. 2, pp. 317–333, 2019.
- [28] P. M. M. Bossuyt, J. B. Reitsma, K. Linnet, and K. G. M. Moons, "Beyond diagnostic accuracy: the clinical utility of diagnostic tests," *Clinical Chemistry*, vol. 58, no. 12, pp. 1636–1643, 2012.
- [29] A. Åsberg, G. Mikkelsen, and I. H. Odsæter, "A new index of clinical utility for diagnostic tests," *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, vol. 79, no. 8, pp. 560–565, 2019.
- [30] S. G. Pauker and J. P. Kassirer, "The threshold approach to clinical decision making," *The New England Journal of Medicine*, vol. 302, no. 20, pp. 1109–1117, 1980.
- [31] S. Graziadio, A. Winter, B. C. Lendrem et al., "How to ease the pain of taking a diagnostic point of care test to the market: a framework for evidence development," *Micromachines*, vol. 11, no. 3, p. 291, 2020.
- [32] P. M. Bossuyt, J. B. Reitsma, D. E. Bruns et al., "The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration," *Clinical Chemistry*, vol. 49, no. 1, pp. 7–18, 2003.
- [33] R. F. Behrsin, C. T. da Silva, G. P. Cardoso, J. L. Barillo, J. B. S. de Souza, and E. G. de Araújo, "Combined evaluation of adenosine deaminase level and histopathological findings from pleural biopsy with Cope's needle for the diagnosis of tuberculous pleurisy," *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, vol. 8, no. 6, pp. 7239–7246, 2015.
- [34] M. Mehta, S. Marwah, H. Shah, and A. Trivedi, "A study of the utility of lactate dehydrogenase, total proteins, and adenosine deaminase in the diagnosis of pleural exudates: a new statistical approach," *International Journal of Medical Science and Public Health*, vol. 4, no. 2, pp. 286–291, 2015.
- [35] A. A. Jadhav and J. S. Bardapurkar, "Diagnostic value of adenosine deaminase to differentiate exudates and transudates," *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 51, no. 2, pp. 170–174, 2007.
- [36] F. Atalay, D. Ernam, H. C. Hasanoglu, A. Karalezli, and Ö. Kaplan, "Pleural adenosine deaminase in the separation of transudative and exudative pleural effusions," *Clinical Biochemistry*, vol. 38, no. 12, pp. 1066–1070, 2005.
- [37] X. Liu, "Classification accuracy and cut point selection," *Statistics in Medicine*, vol. 31, no. 23, pp. 2676–2686, 2012.

ANEXO 4 – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 2

Submit a Manuscript: <https://www.wjccpublishing.com>

World J Clin Cases 2025 July 6; 13(19): 101850

DOI: 10.12998/wjcc.v13.i19.101850

ISSN 2307-8960 (online)

ORIGINAL ARTICLE

Retrospective Cohort Study

Total adenosine deaminase cases as an inflammatory biomarker of pleural effusion syndrome

Bernardo Henrique Ferraz Maranhão, Cyro Teixeira da Silva Junior, Jorge Luiz Barillo, Joeber Bernardo Soares Souza, Patricia Siqueira Silva, Roberto Stirbulov

Specialty type: Medicine, research and experimental

Provenance and peer review: Unsolicited article; Externally peer reviewed.

Peer-review model: Single blind

Peer-review report's classification
Scientific Quality: Grade D, Grade D

Novelty: Grade C, Grade C
Creativity or Innovation: Grade C, Grade C
Scientific Significance: Grade C, Grade C

P-Reviewer: Mohsen Hammad DB; Ulasoglu C

Received: September 28, 2024

Revised: November 4, 2024

Accepted: March 4, 2025

Published online: July 6, 2025

Processing time: 171 Days and 16.7 Hours



Bernardo Henrique Ferraz Maranhão, Department of Specialized Medicine, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 20270004, State of Rio de Janeiro, Brazil

Cyro Teixeira da Silva Junior, Medical Clinics, Federal Fluminense University, Niteroi 24020080, Rio de Janeiro, Brazil

Jorge Luiz Barillo, Department of Thoracic Surgery, General Hospital Santa Teresa, Petropolis 25680-003, Rio de Janeiro, Brazil

Joeber Bernardo Soares Souza, Medical Clinics, Antonio Pedro University Hospital, Niteroi 24020-080, Rio de Janeiro, Brazil

Patricia Siqueira Silva, Professor Mazzini Bueno Tuberculosis Research and Assistance Center, Federal Fluminense University, Niteroi 24020-080, Rio de Janeiro, Brazil

Roberto Stirbulov, Department of Clinics, Rua Baronesa de Itu, São Paulo 1231001, São Paulo, Brazil

Corresponding author: Cyro Teixeira da Silva Junior, MD, PhD, Full Professor, Medical Clinics, Federal Fluminense University, 13 Conceição Avenue, State of Rio de Janeiro, Niteroi 24020080, Rio de Janeiro, Brazil. ctsilvajunior@predialnet.com.br

Abstract

BACKGROUND

Although inflammatory diseases commonly affect the pleura and pleural space, their mechanisms of action remain unclear. The presence of several mediators emphasizes the concept of pleural inflammation. Adenosine deaminase (ADA) is an inflammatory mediator detected at increased levels in the pleural fluid.

AIM

To determine the role of total pleural ADA (P-ADA) levels in the diagnosis of pleural inflammatory diseases.

METHODS

157 patients with inflammatory pleural effusion (exudates, $n = 124$, 79%) and non-inflammatory pleural effusion (transudates, $n = 33$, 21%) were included in this observational retrospective cohort study. The P-ADA assay was tested using a

ANEXO 4 – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 2

Maranhão BHF *et al.* ADA as an inflammatory biomarker

kinetic technique. The performance of the model was evaluated using the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve (AUC). The ideal cutoff value for P-ADA in pleural inflammation was determined using the Youden index in the ROC curve.

RESULTS

The transudates included congestive heart failure ($n = 26$), cirrhosis of the liver with ascites ($n = 3$), chronic renal failure ($n = 3$), and low total protein levels ($n = 1$). The exudate cases included tuberculosis ($n = 44$), adenocarcinoma ($n = 37$), simple parapneumonic effusions ($n = 15$), complicated parapneumonic effusions/empyema ($n = 8$), lymphoma ($n = 7$), and other diseases ($n = 13$). The optimal cutoff value of P-ADA was ≥ 9.00 U/L. The diagnostic parameters as sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, positive and negative likelihood values, odds ratio, and accuracy were 77.69 (95%CI: 69.22-84.75); 68.75 (95%CI: 49.99-83.88); 90.38 and 44.90 (95%CI: 83.03-95.29; 30.67-59.77); 2.48 and 0.32 (95%CI: 2.21-11.2; 0.27-0.51); 7.65 (95%CI: 0.78-18.34), and 75.82 (95%CI: 68.24-82.37), respectively ($\chi^2 = 29.51$, $P = 0.00001$). An AUC value of 0.8107 (95%CI: 0.7174-0.8754; $P = 0.0000$) was clinically useful. The Hosmer-Lemeshow test showed excellent discrimination.

CONCLUSION

P-ADA biomarker has high diagnostic performance for pleural inflammatory exudates.

Key Words: Pleural effusion; Biomarker; Adenosine deaminase; Inflammation; transudate; Exudate

©The Author(s) 2025. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core Tip: Non-specialists find it difficult to diagnose pleural effusions. Although diagnosing the syndrome through imaging is simple, determining the cause is more difficult. To treat pleural disease as soon as possible, it is crucial to determine whether it is inflammatory. To our knowledge, this study is the first in Brazil and the world to establish a reference value with strict statistical criteria to classify inflammatory pleural effusion syndrome.

Citation: Maranhão BHF, Junior CTDS, Barillo JL, Souza JBS, Silva PS, Stibulov R. Total adenosine deaminase cases as an inflammatory biomarker of pleural effusion syndrome. *World J Clin Cases* 2025; 13(19): 101850

URL: <https://www.wjcc.com/2307-8960/full/v13/i19/101850.htm>

DOI: <https://dx.doi.org/10.12998/wjcc.v13.i19.101850>

INTRODUCTION

Pleural effusion syndrome (PES) is an excess of pleural fluid (PF) between the layers of the pleura[1]. Patients with active pleural inflammation or pleurisy complain of acute pain, localized, increasing, or decreasing in intensity, with breathing or coughing. Pleuritic pain tends to subside when an effusion develops. However, the most important clinical effect of pleural effusion is shortness of breath, which can significantly reduce quality of life[1].

Identifying whether a PES is an exudate with inflammatory diseases or a transudate with noninflammatory diseases is the first step in determining its cause. This classification system has important diagnostic implications[1]. Transudative pleural effusion usually represents an outward sign of disease in another organ. Therefore, its main causes are renal, hepatic, and cardiac disorders[1]. Transudate occurs because of hydrostatic or oncotic pressure imbalance. Inflammation was not observed. Therefore, transudates have low cell counts and protein content. Usually, a surgical procedure for PF or tissue extraction is not necessary for causal diagnosis[1]. Exudates occur secondary to diseases that cause inflammation or infection in the pleural space and tissue with increased pleural vascular permeability. Vascular changes allow leukocyte diapedesis and transport of large molecules[2]. Usually, surgical procedures for the withdrawal of PF and/or tissue are necessary for diagnosis and treatment[1]. Inflammatory PF can lead to severe surgical complications, such as empyema and pleural thickening[1].

An inflammation arises from the interaction between immune cells and many mediators that protect an organism from damaging stimuli. Adenosine is an endogenous purine nucleoside that modulates several physiological processes. It is considered a key mediator of the immune response. Under physiological conditions, the extracellular concentrations of adenosine are maintained at low levels as a result of rapid metabolism. However, the highest levels were observed under conditions of increased metabolic demand, such as hypoxia, tissue injury, and inflammation. Under resting conditions, some adenosine triphosphate (ATP) is dephosphorylated to adenosine; however, dangerous stimuli can increase the intracellular conversion of ATP to adenosine. Once released into the extracellular space, adenosine can be deaminated to inosine by adenosine deaminase enzyme (ADA) or taken up directly by cells by specific nucleoside transporters and re-phosphorylated to ATP[3-5].

ADA is an important biomarker in organic fluids of cellular and humoral immune responses and translates to monocyte and macrophage activation. It is also essential for the proliferation and differentiation of lymphoid cells, especially T cells, in inflammatory diseases[6]. ADA induces the production of inflammatory cytokines such as tumor

ANEXO 4 – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 2

Maranhão BHF *et al.* ADA as an inflammatory biomarker

necrosis factor alpha, transforming growth factor beta, and interferon gamma. In humans, total ADA has two isoforms: ADA1 and ADA2. ADA1 is found in all human tissues. It is highly expressed by T and B cells and accounts for approximately 90% of total ADA activity. The primary role of ADA1 is to regulate the intracellular adenosine levels. ADA2 exhibits autocrine activity. It is involved in the maturation of monocytes in anti-inflammatory macrophages (M2), dendritic cells, B cells, neutrophils, and CD26-Tregs. There is indirect evidence of the possible role of ADA2 as an endothelial growth factor[5].

ATP, adenosine, and ADA modulate purinergic responses during inflammation. ADA levels increased in response to higher adenosine levels. As a result, the inflammatory response is amplified[7,8]. Specific studies have demonstrated a relationship between pleural ADA (P-ADA) levels and pleural inflammatory disease. Thus, P-ADA could be relevant in the management of PES. It can indicate the inflammatory nature of pleural effusions. Different studies in several countries conclude that higher levels of P-ADA indicate a greater likelihood of pleural tuberculosis[9,10]. However, elevated P-ADA levels are not exclusive to pleural tuberculosis. Very high levels (> 150 U/L) of P-ADA are unusual in pleural tuberculosis. Alternative diagnoses are bacterial empyema, lymphoma, leukemia, and multiple myeloma[10,11].

Although inflammatory and infectious diseases frequently involve the pleural space and pleura, the immunological and molecular mechanisms underlying pleural involvement remain unknown[7]. Some diseases are associated with the infiltration of different types of immune cells, such as neutrophils, eosinophils, and lymphocytes. In addition to infiltrating cells, mesothelial cells actively participate in pleural inflammation by releasing various mediators and proteins. Increased levels of several inflammatory mediators have been detected in PF, including lipid, cytokines, and proteins. The presence of these mediators emphasizes the concept of pleural inflammation. Moreover, certain inflammatory mediators appear to characterize a specific cause of PES[12]. This study aimed to determine the role of total pleural adenosine deaminase (P-ADA, U/L; adenosine amino hydrolase; enzyme code 3.5.4.4) level as a biomarker for the diagnosis of pleural inflammatory diseases.

MATERIALS AND METHODS

The STARD and STROBE recommendations were followed in the study design, findings, and reporting[13,14]. Our investigation was a traditional observational retrospective cohort analysis or chart review of a type series of cases performed at two hospitals in Rio de Janeiro, Brazil, between March 2015 and December 2019.

Inclusion and exclusion criteria

Clinical and imaging evaluations were performed to confirm the causative diagnosis of PES[1]. An initial thoracentesis procedure was performed, followed by video-assisted thoracoscopic surgery (VATS) and histopathological analysis if necessary[1]. The diagnosis of pleural transudate was confirmed using the Maranhão and Silva Junior criterion[15]. This was validated according to Light's criterion, but with dosages of total protein and total lactate dehydrogenase (LDH) only in the PF[16]. The exclusion criteria were absolute contraindications or refusal to undergo thoracentesis or VATS, hemolysis in PF, chronic renal failure, jaundice, PES of unknown cause, and use of immunosuppressive medications. This is because ADA levels may be modulated by antiretroviral therapy in HIV subjects[6].

ADA assay

Adequate collection, storage, and processing of PF were observed for accurate diagnosis. The PF used for the P-ADA test was non-hemolyzed[17]. The PF preserved at -20 °C were thawed, and several biomarkers in the samples were measured. The ADA was performed using a commercial kit with a kinetic approach. Briefly, the P-ADA assay is based on the enzymatic deamination of adenosine to inosine, which is then converted to hypoxanthine by purine nucleoside phosphorylase. Hypoxanthine is transformed to uric acid and hydrogen peroxide by xanthine oxidase. Hydrogen peroxide reacts with N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfoethyl)-3-methylaniline and 4-aminoantipyrine in the presence of peroxidase to generate a quinone dye, which was measured in a kinetic manner. One unit of P-ADA was defined as the amount of ADA that generates one μ mol of inosine from adenosine per minute at 37 °C. The assay was linear from 0-200 U/L ($r^2 > 0.99$). Ultracentrifugation did not affect the results. ADA was stable for one week at 4 °C. The reagents were stable for one year if stored at 2-8 °C in amber flasks. ADA activity in the serum of healthy humans has a reference value range of 0-15 U/L[18]. This ADA assay with automated kinetic methods was also validated for various organic fluids, and there were no differences in the diagnostic accuracy for pleural tuberculosis between the classic manual method of Giusti and this Diazyme ADA assay method[19,20].

Statistical approach

Descriptive and inferential statistics, with receiver operating characteristic (ROC) curve analysis, were analyzed using a combination of the statistical software including NCSS version 2022, GraphPad version 5.0, and MedCalc version 20.11. The Grubbs double-sided method, which examines the most extreme values on both sides of the data, was used to detect the outliers. The normality and variance homogeneity of the data were evaluated using the Shapiro-Wilk test (W). An unpaired *t*-test with standard deviation was used to compare the means of the two groups with a Gaussian distribution. The median and interquartile range were used to express non-normal distributions (IQR). When the sample was not normally distributed, the Wilcoxon-Mann-Whitney *U* test was used to compare data. The non-parametric Kruskal-Wallis (K-W) test (*H*-test) was used to check the hypothesis that several unpaired samples originated from the same population. A *post-hoc* test, according to Dunn's test, was performed when the K-W test had a *P* value less than the selected significance level. The χ^2 test was used to compare groups and proportions. The *P*-value for both sides was 0.05.

ANEXO 4 – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 2

Maranhão BHF *et al.* ADA as an inflammatory biomarker

Sample size and sampling technique

The sample size calculation was based on the expected area under the ROC curve ($AUC > 0.50$), null value of the AUC ($AUC = 0.50$), and ratio of sample sizes between positive and negative cases ($n = 2$) according to the MedCalc software [21]. For an α -level of 0.05 and a β -level of 0.20 (statistical power = 80%), a sample of 19 cases was required in the positive group (exudates) and 38 in the negative group (transudates), giving a total of 57 cases. The sample size in this study consisted of 157 PF samples from 157 patients with proven transudative or non-inflammatory diseases used as controls ($n = 33$) and exudative pleural effusions with inflammatory diseases of several causes ($n = 124$). Bias was avoided because the data was recorded in a series of patients only with PES (cases and controls) with the purpose of management after a standard diagnostic protocol. In case series, information bias can occur but may be reduced by selecting an appropriate control group [14].

Optimal P-ADA threshold

The nonparametric technique of DeLong *et al.* [22] was used to obtain the ROC curve to study the diagnostic parameters of P-ADA as an inflammatory biomarker. Youden index was used to determine the optimal P-ADA threshold (J). The J value is the highest sum of sensitivity and specificity [22,23].

Model performance, discrimination, and potential clinical usefulness

Model performance refers to how well a statistical model fits the data used to build it. It was evaluated using metrics such as AUC-ROC and diagnostic parameters with 95%CI [13,14]. Discrimination refers to the ability of a biomarker to distinguish between individuals with and without a disease or condition. Discrimination was classically evaluated using AUC-ROC (C-statistic) with 95%CI [24,25]. Hosmer and Lemeshow proposed the following classifications as general rules for the discrimination accuracy of a logistic regression model based on the AUC space [24]: Excellent discrimination (0.90-1.0), very good discrimination (0.80-0.90), good discrimination (0.70-0.80), sufficient discrimination (0.60-0.70), poor discrimination (0.50-0.60), and biomarker not useful (0.00-0.50). Clinical usefulness refers to whether a biomarker has practical utility in a clinical setting, such as in helping to diagnose a disease, predicting disease progression, or guiding treatment decisions. The potential clinical usefulness of P-ADA was evaluated using the AUC for diagnostic biomarkers in general, an $AUC > 0.75$ is clinically useful [26].

RESULTS

The 157 cases and causes of pleural exudates and transudates are represented with demographic information in Table 1. Exudates were more common than transudates [124 (79%) vs 33 (21%) patients, respectively]. Regarding the male sex, there was no significant difference in the proportion, as calculated by the χ^2 test, between exudates and transudates ($P = 0.9415$). The same was observed for the female sex in both groups ($P = 0.9416$). In the χ^2 test, only adenocarcinoma and lymphomas were significant ($P = 0.0021$ and $P = 0.0003$, respectively) for male sex.

Many quantitative studies on clinical biomarkers have demonstrated age-related changes in reference values. Early life, adolescence, old age, and after the menopause are important periods of life [27]. Regarding age, there was a significant difference in the medians ($U = 895$, $P < 0.0001$) between exudates (58.0; IQR: 41.5-73.5) and transudates (76.0; IQR: 63.0-86.25). However, it was not an objective of this study to evaluate a cutoff for P-ADA in relation to the range of ages for inflammatory diseases in PES.

The pattern of missing data was MAR or missing randomly. Only 3% of exudates (cases) and 6% of transudates (controls) had missing P-ADA values. For inflammatory diseases (exudates) in a patient with lymphoma, the Grubbs test yielded an outside value of 1121.1 U/L of P-ADA. There were no digitation errors, and this value was consistent with causal diagnosis. However, a median of 18.4 U/L was used (Table 2).

Table 3 shows that the median values of P-ADA were significantly different ($U = 679.5$; $P < 0.0001$) between inflammatory (18.4 U/L, IQR: 9.85-41.4) and non-inflammatory diseases (6.85 U/L, IQR: 2.67-11.26). The values of total protein and total LDH in the PF were in agreement with the Light and Maranhão and Silva Junior criteria [15,16].

Figure 1 shows the ROC curve obtained using the method described by DeLong *et al.* [22]. For diagnostic purposes with inflammatory pleural effusions, according to the Youden index, the optimal cutoff value was ≥ 9.00 U/L of P-ADA. For discrimination of the model, there was an AUC of 0.8107, a 95%CI of 0.7174-0.8754. The standard error of the mean (SE) was 0.039. The Z-value to test was 7.837, with a two-sided P-value of 0.0000. The diagnostic parameters for P-ADA, with the best cutoff point selected for pleural inflammatory diseases, are listed in Table 4.

DISCUSSION

Retrospective studies sometimes reflect routine clinical practice better than prospective studies, although they may fail to identify all eligible patients and often result in lower quality data with more missing data. In this study, the author took care of the inclusion and exclusion criteria and the statistical treatment of missing data [13].

ADA modulates the immune system and plays an important role in several diseases, including rheumatoid arthritis with ADA modulating metabolic remodeling and joint destruction; chronic pulmonary diseases with ADA participating in modulating purinergic responses; inflammatory bowel diseases with ADA involved in modulating purinergic responses; sepsis with ADA playing a key role in modulating purinergic responses; and pleural tuberculosis with ADA

ANEXO 4 – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 2

Maranhão BHF *et al.* ADA as an inflammatory biomarker

Table 1 Demographic characteristics and causes of inflammatory and noninflammatory diseases in 157 patients with pleural effusion syndrome in the State of Rio de Janeiro, Brazil, from March 2015 to December 2019, *n* (%) / median (25th-75th percentiles)

Cause	Patient (n)	Prevalence (%)	Age	Female	Male
Non-inflammatory ¹	33	21.0	76.0 (63.0-86.25)	17.0 (52.0)	16.0 (48.0)
Inflammatory	124	79.0	58.0 (41.5-73.5)	66.0 (53.0)	58.0 (47.0)
Tuberculosis	44	28.0	39.0 (29.7-58.2)	22.0 (50.0)	22.0 (50.0)
Adenoc.	37	24.0	61.0 (45.0-77.0)	25 (68.0)	12 (32.0)
Simple PPE	15	10.0	67.0 (56.0-85.0)	6 (40.0)	9 (60.0)
CPPE/Empyema	8	5.0	52.5 (33.5-78.75)	2 (25.0)	6 (75.0)
Lymphoma	7	4.0	53.0 (47.0-63.0)	0 (0.0)	7 (100.0)
Squamous cell	7	4.0	66.0 (55.0-66.0)	4 (57.0)	3 (43.0)
Other ²	6	4.0	73.0 (53.0-79.0)	4 (67.0)	2 (33.0)
Total	157	100.0	58.0 (41.75-73.25)	80 (51.0)	77 (49.0)

¹Transudates: Congestive heart failure (*n* = 26), chronic renal failure (*n* = 3), cirrhosis of liver with ascites (*n* = 3), and serum low total protein levels (*n* = 1).

²Other exudates: Pseudo-Meigs syndrome (*n* = 1), Dressler's syndrome (*n* = 3), chylothorax (*n* = 1), leukemia (*n* = 1).

CPPE: Complicated parapneumonic effusions.

Table 2 Levels of pleural adenosine deaminase evaluated in 157 cases of pleural effusion syndrome confirmed with reference standard diagnostic tests¹

Cause	Pleural fluids-sample size (n)	P-ADA (medians) (U/L)	25 th -75 th percentile
Non-inflammatory disease (control)			
Transudate	33	6.85	2.67-11.26
Inflammatory disease (case)	124	18.4	9.25-41.4
Tuberculosis	44	42.0	32.9-61.9
Adenocarcinoma	37	9.75	6.7-14.9
Simple parapneumonic effusion	15	9.38	5.68-9.97
CPPE and empyema	8	32.9	16.0-61.7
Lymphoma	7	401.2	11.2-990.5
Squamous cell carcinoma	7	13.11	11.0-28.2
Other	6	15.2	7.4-49.0

¹Shapiro-Wilk test for pleural adenosine deaminase (*W* = 0.347, *P* < 0.0001). K-W test for pleural adenosine deaminase (*H* = 81.34, *P* < 0.0001) and Dunn's test with *P* < 0.05: Tuberculosis vs transudates, vs simple PPE, and vs adenocarcinoma, and *P* > 0.05: CPPE and empyemas, lymphomas, squamous cell carcinoma, and other exudates.

CPPE: Complicated parapneumonic effusions; P-ADA: Pleural adenosine deaminase.

deeply inducing the production of inflammatory cytokines in PF[4].

The pleura and the pleural space have fascinating pathophysiologicals. Many pleural diseases are associated with local and systemic inflammations[7]. However, the underlying inflammatory mechanisms have not yet been elucidated. This study described the causes of various pleural inflammatory diseases. The role of adenosine deaminase as a diagnostic biomarker was evaluated using rigorous statistical methods.

As shown in Table 1, the sex proportion and median age were comparable to those reported in earlier studies[9-11]. The prevalence of tuberculosis and malignancy was similar to those reported in other studies[9-11]. Other authors have studied P-ADA in pleural inflammatory diseases from medical thoracoscopy, but tuberculosis was not in the group analyzed[28].

The P-ADA level was statistically significant in separating pleural transudates and inflammatory diseases, mainly tuberculosis, as shown in Table 2. In Brazil and other countries with an elevated incidence and prevalence of tuberculosis and other inflammatory diseases, P-ADA activity is also an accurate biomarker for tuberculous pleural effusion with false-positive results for complicated parapneumonic effusions, empyema, and lymphoma[10,29-31]. As shown in

ANEXO 4 – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 2

Maranhão BHF *et al.* ADA as an inflammatory biomarker**Table 3** Laboratory analysis of adenosine deaminase, proteins, and lactate dehydrogenase in 157 cases of pleural fluids from inflammatory and non-inflammatory pleural effusion syndrome, median (25th-75th percentiles)^a/ mean $\pm$ SD^b

Non-inflammatory pleural effusion (control)	Result
Total pleural ADA ^a	6.85 (2.67-11.26)
Total pleural protein ^b	2.64 $\pm$ 1.52
Total pleural LDH, median ^c	190.5 (100.5-278.8)
Inflammatory pleural effusion (case)	
Total pleural ADA ^a	18.4 (9.25-41.4)
Total pleural protein ^b	5.05 (4.47-5.60)
Total pleural LDH ^c	568.5 (400.3-822.5)

^aThe Shapiro-Wilk test (W) rejected the normal data from pleural total adenosine deaminase, and pleural total LDH in exudate cases ($P < 0.05$), but not pleural total protein in controls ($P = 0.0881$).

^b $P < 0.0001$.

^c $P < 0.0001$, after logarithmic transformation of data.

^d $P < 0.0001$.

ADA: Adenosine deaminase; LDH: Lactate dehydrogenase; IQR: Interquartile range.

Table 4 Measures of diagnostic parameters of adenosine deaminase following selection of the best cutoff point for pleural inflammatory diseases according to the Youden index in the receiver operating characteristic curve

Diagnostic parameter	Result (%) ^a	95%CI
Best cutoff (U/L)	≥ 9.00	-
Sensitivity	77.69	69.22-84.75
Specificity	68.75	49.99-83.88
Positive predictive value or precision	90.38	83.03-95.29
Negative predictive value	44.90	30.67-59.77
Positive likelihood ratio ^b	2.48	2.21-11.2
Negative likelihood ratio ^b	0.32	0.27-0.51
Diagnostic odds ratio	7.65	0.78-18.34
Diagnostic or predictive accuracy ^c	75.82	68.24-82.37
Disease prevalence ^d	50.48	44.78-56.17

^aThese values are dependent on disease prevalence.

^b $\chi^2 = 29.5138$ (2-Sided P -value = 0.00001). Statnote: The Youden index at the receiver operating characteristic curve is the optimal cutoff value that provides the best tradeoff between sensitivity and specificity.

Table 2, the Kolmogorov-Smirnov test was significant for the P-ADA classification of inflammatory and non-inflammatory diseases ($H = 81.34$, $P < 0.0001$). Dunn's test was significant ($P < 0.05$) for pleural tuberculosis vs transudates, simple PPE, and adenocarcinoma. However, the difference was not significant ($P > 0.05$) for pleural tuberculosis vs. CPPE, empyemas, lymphomas, squamous cell carcinoma, and other exudates.

In adenocarcinoma, tumor cells induce immune suppression through the accumulation of regulatory T cells (Tregs) and many other mechanisms[32]. The increase in total P-ADA levels in pleural tuberculosis is largely caused by the ADA-2 isoenzyme present in monocytes and macrophages in response to pleural infection or inflammation caused by *Mycobacterium tuberculosis*[29]. Inflammatory processes in pneumonia occur in the peripheral alveolar spaces. Increased vascular permeability of local capillaries may lead to increased fluid accumulation in the lungs and pleural cavities. In addition, locally released inflammatory mediators may diffuse into the subpleural or pleural tissue, resulting in the local activation of constitutive cells such as mesothelial cells. Moreover, circulating inflammatory cells migrate into the pleural cavity. The predominance of an inflammatory white cell count within PF is of limited diagnostic value[1,30]. However, immunocytochemical analysis should be used to differentiate malignant cell types[1].

ADA-1 Levels play an important role in the differentiation of lymphoid cells, and ADA-2 in the maturation of monocytes into macrophages[4,29]. P-ADA activity in T-cell lymphomas is similar to that in B-cell lymphoma[31]. The median P-ADA level for the lymphoma patients was 401.2 U/L (Table 2). When total P-ADA levels are greater than 150

ANEXO 4 – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 2

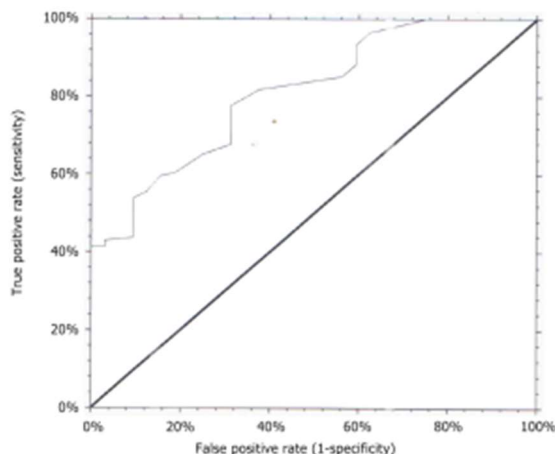
Maranhão BHF *et al.* ADA as an inflammatory biomarker

Figure 1 Nonparametric receiver operating characteristic curve of pleural adenosine deaminase for pleural inflammatory diseases. The selection criterion was the Youden index [$J = 0.4644$; distance to the receiver operating characteristic (ROC) curve corner = 0.3840]. The optimal cutoff value for ROC curve concavity was ≥ 9.00 U/L of pleural adenosine deaminase. Evaluation metric for checking the model's performance: Area under the curve (AUC), 0.8107; 95%CI: 0.7174-0.8754; SE: 0.039; Z-value to test (AUC $\neq$ 0.5), 7.837; 2-Sided P-value, 0.0000.

U/L, the differential diagnosis is CPPE, empyema, and lymphoid malignancies instead of tuberculous pleural effusion [31]. Therefore, in patients with cancer risk, high P-ADA levels should be interpreted with caution [33].

The median P-ADA levels were significantly lower in non-inflammatory diseases or transudates (6.85 U/L) than in inflammatory diseases or exudates (18.4 U/L) as shown in Table 3. The explanation for these findings is that a transudate, as opposed to an exudate, indicates that the pleural mesothelium is affected by systemic and/or pulmonary pressures. The barrier permeability characteristics were maintained. ADA has a low molecular radius of 29.10 angstroms and weight of 42 kDa. Therefore, transpleural transport from sera occurs via diffusion [2].

Depending on the objectives of biomarker dosage, several methods for selecting an optimal cutoff value have been proposed by expert authors [23,34]. The repercussions of receiving a false-positive diagnostic test result are serious. Therefore, it was crucial to choose an optimal cutoff value of P-ADA greater than or equal to 9.00 U/L for inflammatory diseases with high precision (90%) using the Youden index (Table 4). It is important to explain that there is no disagreement between the cutoff value greater than or equal to 9.0 U/L of P-ADA calculated by the ROC curve using the Youden criterion for pleural inflammatory diseases and the cut-off value found in the literature greater than or equal to 30.0 U/L. This last cutoff value of P-ADA was calculated using several criteria for the diagnosis of pleural tuberculosis [10]. Huan *et al.* [35] established a P-ADA cutoff value of 29.6 U/L for tuberculosis pleural effusion (TPE). The authors concluded that optimizing the utility of P-ADA helps clinicians diagnose TPE when other initial laboratory workups are inconclusive. Masood *et al.* [36] found a cutoff level for P-ADA of 30 U/L for tuberculosis PF with high sensitivity (71%) and specificity (82%).

The AUC indicates the potential of a biomarker. For clinical and practical purposes, we need to dichotomize the test results to classify the subjects as diseased or nondiseased. Therefore, the choice of an 'optimal' cutoff point for dichotomizing a continuous biomarker cannot be arbitrary. Youden's index is a better criterion because it selects biomarkers with larger values of both sensitivity and specificity [37]. The discrimination with an AUC of 0.8107 was very good according to the Hosmer-Lemeshow scale [24]. An AUC greater than 0.75 was clinically useful [26]. Another metric for evaluating the clinical usefulness of a biomarker is the clinical utility index, established by Åsberg *et al.* [38]. There is some overlap between the evaluations of different aspects of the biomarker performance. Therefore, it is important to evaluate biomarkers using multiple metrics and consider the context in which they will be used [13,14]. In addition to the AUC, other values derived from the ROC curve are useful to define diagnostic characteristics of a biomarker. In contrast to diagnostic accuracy, predictive values provide more specific information of a biomarker. A high positive predictive value (PPV $\geq$ 80%) would be adequate to perform a diagnostic and initiate a treatment [39,40]. The PPV value found in this work for inflammatory PF was $> 90\%$, as shown in Table 4. Yavuz *et al.* [41] found a high sensitivity (91%) with a cutoff level of P-ADA greater or equal to 20.0 U/L for TPE. However, they observed a PPV of 67% and a specificity of 75%.

Despite its observational methodology, this study had limitations. Before adopting accurate models in clinical practice, additional studies using data from many hospitals are required for external validation [13,14]. Thus, a multicenter, worldwide study with accurately diagnosed cases with the highest number of subjects is necessary.

The future perspectives are positive. First, our diagnostic model is crucial in clinical practice and can be used to identify inflammatory pleural effusions with acceptable discrimination and predictive power. In addition, P-ADA levels also had high diagnostic performance for pleural tuberculosis worldwide (VPP $> 80\%$) and rendered closed-needle

ANEXO 4 – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 2

Maranhão BHF *et al.* ADA as an inflammatory biomarker

pleural biopsy unnecessary[9,10,20,33,35,42]. Second, purinergic signaling plays an important role in lung inflammation. The expression of adenosine receptors is altered in patients with airway inflammation. Adenosine receptor antagonists such as theophylline have therapeutic benefits in several inflammatory pulmonary diseases. Adenosine signaling has also been implicated in regulating the function of inflammatory cells such as macrophages and neutrophils[43]. Third, physiologically and acutely increased adenosine levels are associated with beneficial effects such as vasodilation and a decrease in inflammation. In contrast, chronic overproduction of adenosine occurs under pathological conditions and is responsible for the adverse effects of adenosine associated with chronic lung and pleural inflammation, fibrosis, and tissue injury[44].

CONCLUSION

This study concluded that the P-ADA biomarker with the cutoff selected (≥ 9.0 U/L) using ROC curve analysis with the Youden index criterion had a high diagnostic performance for pleural inflammatory exudates.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author, Cyro Teixeira da Silva Junior, is grateful to Professor Charles E. Metz (in memoriam) from the University of Chicago Medical Center for suggestions with ROC curve analysis that helped improve several papers in your academic career.

FOOTNOTES

Author contributions: Maranhão BHF and Stibulov R executed the idea and planned, organized, and supervised the study; Souza JBS, Barillo JL, and Silva PS were responsible for data collection; da Silva Junior CT wrote the earlier and final drafts of the manuscript and was responsible for statistical analysis and interpretation of the results. All authors have read and approved the manuscript.

Institutional review board statement: This study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Federal Fluminense University (number 48946121.9.0000.5243).

Informed consent statement: Written informed consent was obtained from all participants before the study.

Conflict-of-interest statement: The authors declare that they have no conflicts of interest regarding the content of this article. Funding: The authors received no financial support for the research, authorship, or publication of this article.

Data sharing statement: sharing statement: The corresponding author can provide datasets that support the conclusions of this study upon request. The original datasets are not accessible to the general public because they contain data that may jeopardize the privacy of research participants.

STROBE statement: The authors have read the STROBE Statement-checklist of items, and the manuscript was prepared and revised according to the STROBE Statement-checklist of items.

Open Access: This article is an open-access article that was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution NonCommercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Country of origin: Brazil

ORCID number: Bernardo Henrique Ferraz Maranhão 0000-0002-4793-552X; Cyro Teixeira da Silva Junior 0000-0003-0067-1341; Jorge Luiz Barillo 0000-0002-6654-4997; Joeber Bernardo Soares Souza 0000-0002-1494-1050; Patricia Siqueira Silva 0000-0002-7397-8152; Roberto Stibulov 0000-0003-0841-8105.

Corresponding Author's Membership in Professional Societies: Sociedade Brasileira de Pneumologia.

S-Editor: Liu H

L-Editor: A

P-Editor: Zhang XD

ANEXO 4 – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 2

Maranhão BHF et al. ADA as an inflammatory biomarker

REFERENCES

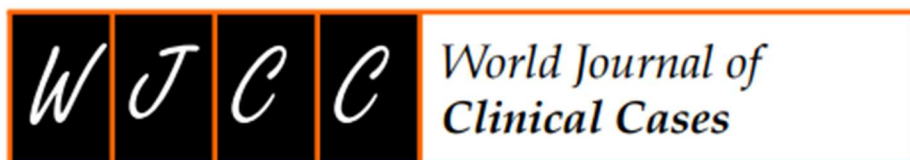
- Hooper C, Lee YC, Maskell N; BTS Pleural Guideline Group. Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society Pleural Disease Guideline 2010. *Thorax* 2010; **65** Suppl 2: ii4-ii7 [PMID: 20696692 DOI: 10.1136/thx.2010.136978]
- Apostolidou E, Tsilioni I, Hatzoglou C, Molyvdas PA, Gourgoulis KL. Pleural transport physiology: insights from biological marker measurements in transudates. *Open Respir Med J* 2011; **5**: 70-72 [PMID: 22114657 DOI: 10.2174/1874306401105010070]
- Pasquini S, Contri C, Borea PA, Vincenzi F, Varani K. Adenosine and Inflammation: Here, There and Everywhere. *Int J Mol Sci* 2021; **22** [PMID: 34299305 DOI: 10.3390/ijms22147685]
- Antonelli L, Colucci R, La Motta C, Tuccori M, Awwad O, Da Settimo F, Blandizzi C, Formai M. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. *Curr Drug Targets* 2012; **13**: 842-862 [PMID: 22250650 DOI: 10.2174/138945012800564095]
- Zhulai G, Oleinik E, Shibaev M, Ignatiev K. Adenosine-Metabolizing Enzymes, Adenosine Kinase and Adenosine Deaminase, in Cancer. *Biomolecules* 2022; **12** [PMID: 35327609 DOI: 10.3390/biom12030418]
- Conesa-Buendía FM, Llamas-Granda P, Atencio P, Cabello A, Górgolas M, Largo R, Herrero-Beaumont G, Mediara A. Adenosine Deaminase as a Biomarker of Tenofovir Mediated Inflammation in Naive HIV Patients. *Int J Mol Sci* 2020; **21** [PMID: 32438744 DOI: 10.3390/ijms21103590]
- Karpathiou G, Pécot M, Sundaralingam A, Rahman N, Froudarakis ME. Inflammation of the Pleural Cavity: A Review on Pathogenesis, Diagnosis and Implications in Tumor Pathophysiology. *Cancers (Basel)* 2022; **14** [PMID: 35326567 DOI: 10.3390/cancers14061415]
- Le TT, Berg NK, Harting MT, Li X, Eltschig HK, Yuan X. Purinergic Signaling in Pulmonary Inflammation. *Front Immunol* 2019; **10**: 1633 [PMID: 31379836 DOI: 10.3389/fimmu.2019.01633]
- McNally E, Ross C, Gleeson LE. The tuberculous pleural effusion. *Breathe (Sheff)* 2023; **19**: 230143 [PMID: 38125799 DOI: 10.1183/20734735.0143-2023]
- Morisson P, Neves DD. Evaluation of adenosine deaminase in the diagnosis of pleural tuberculosis: a Brazilian meta-analysis. *J Bras Pneumol* 2008; **34**: 217-224 [PMID: 18425258 DOI: 10.1590/s1806-37132008000400006]
- Choe J, Shin SH, Jeon K, Huh HJ, Park HD, Jeong BH. Features which discriminate between tuberculosis and haematologic malignancy as the cause of pleural effusions with high adenosine deaminase. *Respir Res* 2024; **25**: 17 [PMID: 38178065 DOI: 10.1186/s12931-023-02645-6]
- Kroegel C, Antony VB. Immunobiology of pleural inflammation: potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. *Eur Respir J* 1997; **10**: 2411-2418 [PMID: 9387973 DOI: 10.1183/09031936.97.10102411]
- Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig L, Lijmer JG, Moher D, Rennie D, de Vet HC, Kressel HY, Rifai N, Gohil RM, Altman DG, Hooft L, Korevaar DA, Cohen JF; STARD Group. STARD 2015: An Updated List of Essential Items for Reporting Diagnostic Accuracy Studies. *Clin Chem* 2015; **61**: 1446-1452 [PMID: 26510957 DOI: 10.1373/clinchem.2015.246280]
- von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP; STROBE Initiative. The Strengthening of Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *J Clin Epidemiol* 2007; **61**: 344-349 [PMID: 18313558 DOI: 10.1016/j.jclinepi.2007.11.008]
- Maranhão BHF, Silva Junior CT, Chibante AM, Cardoso GP. Determination of total proteins and lactate dehydrogenase for the diagnosis of pleural transudates and exudates: redefining the classical criterion with a new statistical approach. *J Bras Pneumol* 2010; **36**: 468-474 [PMID: 20835594 DOI: 10.1590/s1806-37132010000400012]
- Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball WC Jr. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med* 1972; **77**: 507-513 [PMID: 4642731 DOI: 10.7326/0003-4819-77-4-507]
- Michael CW, Davidson B. Pre-analytical issues in effusion cytology. *Pleura Peritoneum* 2016; **1**: 45-56 [PMID: 30911607 DOI: 10.1515/pp-2016-0001]
- Delacour H, Sauvaget C, Ceppa F, Burnat P. Analytical performances of the Diazyme ADA assay on the Cobas® 6000 system. *Clin Biochem* 2010; **43**: 1468-1471 [PMID: 20850428 DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2010.09.005]
- Allison TR, Hunsaker JH, La'ulu SL, Genzen JR. Evaluation of an adenosine deaminase (ADA) assay in serum, pleural, pericardial, peritoneal, and cerebrospinal fluids on the Roche cobas c501 analyzer. *Clin Biochem* 2022; **109-110**: 57-63 [PMID: 36122696 DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2022.09.005]
- Palma RM, Bielsa S, Esquerda A, Martínez-Alonso M, Porcel JM. Diagnostic Accuracy of Pleural Fluid Adenosine Deaminase for Diagnosing Tuberculosis. Meta-analysis of Spanish Studies. *Arch Bronconeumol (Engl Ed)* 2019; **55**: 23-30 [PMID: 30612601 DOI: 10.1016/j.arbres.2018.05.007]
- Negida A, Fahim NK, Negida Y. Sample Size Calculation Guide - Part 4: How to Calculate the Sample Size for a Diagnostic Test Accuracy Study based on Sensitivity, Specificity, and the Area Under the ROC Curve. *Adv J Emerg Med* 2019; **3**: e33 [PMID: 31410410 DOI: 10.22114/ajem.v0i0.158]
- DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988; **44**: 837-845 [PMID: 3203132 DOI: 10.2307/2531595]
- Hajian-Tilaki K. The choice of methods in determining the optimal cut-off value for quantitative diagnostic test evaluation. *Stat Methods Med Res* 2018; **27**: 2374-2383 [PMID: 28673124 DOI: 10.1177/0962280216680383]
- Hosmer DW, Lemeshow S, Sturdivant RX. Applied Logistic Regression. John Wiley and Sons, 2013 [DOI: 10.1002/9781118548387]
- Metz CE. Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med* 1978; **8**: 283-298 [PMID: 112681 DOI: 10.1016/s0001-2998(78)80014-2]
- Fan J, Upadhye S, Worster A. Understanding receiver operating characteristic (ROC) curves. *CJEM* 2006; **8**: 19-20 [PMID: 17175625 DOI: 10.1017/s1481803500013336]
- Bales HD, Erdem F, Bozkurt Yavuz H, Doğusan AR. Age-related Changes in Laboratory Test Results in Home Health Services: A Retrospective Study. *Eur Arch Med Res* 2024; **40**: 81-87 [DOI: 10.4274/eumr.galenos.2024.22599]
- Liu XT, Dong XL, Zhang Y, Fang P, Shi HY, Ming ZJ. Diagnostic value and safety of medical thoracoscopy for pleural effusion of different causes. *World J Clin Cases* 2022; **10**: 3088-3100 [PMID: 35647131 DOI: 10.12998/wjcc.v10.i10.3088]
- Valdés L, San José E, Álvarez D, Valle JM. Adenosine deaminase (ADA) isoenzyme analysis in pleural effusions: diagnostic role, and relevance to the origin of increased ADA in tuberculous pleurisy. *Eur Respir J* 1996; **9**: 747-751 [PMID: 8726940 DOI: 10.1183/09031936.96.09040747]
- Liam CK, Lim KH, Wong CM. Differences in pleural fluid characteristics, white cell count and biochemistry of tuberculous and malignant

ANEXO 4 – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 2

Maranhão BHF et al. ADA as an inflammatory biomarker

- pleural effusions. *Med J Malaysia* 2000; **55**: 21-28 [PMID: 11072486]
- 31 Yao CW, Wu BR, Huang KY, Chen HJ. Adenosine deaminase activity in pleural effusions of lymphoma patients. *QJM* 2014; **107**: 887-893 [PMID: 24854180 DOI: 10.1093/qjmed/hcu106]
- 32 Whiteside TL, Mandapathil M, Schuler P. The role of the adenosine pathway in immunosuppression mediated by human regulatory T cells (Treg). *Curr Med Chem* 2011; **18**: 5217-5223 [PMID: 22087822 DOI: 10.2174/092986711798184334]
- 33 Michot JM, Madec Y, Bulfon S, Thorette-Tcherniak C, Fortineau N, Noël N, Lambotte O, El Jahiri Y, Delacour H, Delfraissy JF, Blanc FX. Adenosine deaminase is a useful biomarker to diagnose pleural tuberculosis in low to medium prevalence settings. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; **84**: 215-220 [PMID: 26707067 DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.11.007]
- 34 Habibzadeh F, Habibzadeh P, Yadollahie M. On determining the most appropriate test cut-off value: the case of tests with continuous results. *Biochem Med (Zagreb)* 2016; **26**: 297-307 [PMID: 27812299 DOI: 10.11613/BM.2016.034]
- 35 Huan N, Khor IS, Ramarmuty HY, Lim MY, Ng KC, Syaripuddin A, Lee QZ, Teo WJ, Sivaraman Kannan KK. Optimising the utility of pleural fluid adenosine deaminase for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Proc Singapore Healthc* 2021; **30**: 271-278 [DOI: 10.1177/2010105820978998]
- 36 Masood KI, Shahid S, Jabeen K, Farooqi J, Kerawala SR, Irfan M. Diagnostic accuracy of different cut-off values of adenosine deaminase levels in tuberculous pleural effusion. *J Pak Med Assoc* 2023; **73**: 13-16 [PMID: 36841999 DOI: 10.47391/JPMA.4773]
- 37 Le CT. A solution for the most basic optimization problem associated with an ROC curve. *Stat Methods Med Res* 2006; **15**: 571-584 [PMID: 17260924 DOI: 10.1177/0962280206070637]
- 38 Åsberg A, Mikkelsen G, Odsæter IH. A new index of clinical utility for diagnostic tests. *Scand J Clin Lab Invest* 2019; **79**: 560-565 [PMID: 31675254 DOI: 10.1080/00365513.2019.1677938]
- 39 Méndez Hernández R, Ramasco Rueda F. Biomarkers as Prognostic Predictors and Therapeutic Guide in Critically Ill Patients: Clinical Evidence. *J Pers Med* 2023; **13** [PMID: 36836567 DOI: 10.3390/jpm13020333]
- 40 Eisenberg MJ. Accuracy and predictive values in clinical decision-making. *Cleve Clin J Med* 1995; **62**: 311-316 [PMID: 7586487 DOI: 10.3949/ccjm.62.5.311]
- 41 Yavuz MY, Doğan BI, Anar C, Büyüksirin M, Güldaval F, Alic IO. Tüberküloz Pnöresiye Parapnömonik Efüzyon ve Malign Efüzyondan Ayırmak İçin Plevral Sıvı Biyokimyasal Parametreleri ve Oranlarının Tanısal Değeri. *Göğüs Hastanesi Dergisi* 2023; **37**: 34-40 [DOI: 10.14744/ghd.2023.85520]
- 42 Behrsin RF, Junior CT da S, Cardoso GP, Araujo EG. Combined evaluation of adenosine deaminase level and histopathological findings from pleural biopsy with Cope's needle for the diagnosis of tuberculous pleurisy. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; **8**: 7239-7246 [PMID: 26261621]
- 43 Blackburn MR, Volmer JB, Thrasher JL, Zhong H, Crosby JR, Lee JJ, Kellems RE. Metabolic consequences of adenosine deaminase deficiency in mice are associated with defects in alveogenesis, pulmonary inflammation, and airway obstruction. *J Exp Med* 2000; **192**: 159-170 [PMID: 10899903 DOI: 10.1084/jem.192.2.159]
- 44 Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pathological overproduction: the bad side of adenosine. *Br J Pharmacol* 2017; **174**: 1945-1960 [PMID: 28252203 DOI: 10.1111/bph.13763]

ANEXO 5 – EDITORIAL REFERENTE AO ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 2



Submit a Manuscript: <https://www.fapublishing.com>

World J Clin Cases 2025 July 26; 13(21): 106945

DOI: 10.12998/wjcc.v13.i21.106945

ISSN 2307-8960 (online)

EDITORIAL

Tired of the confusion around pleural effusions: Adenosine deaminase detection sets the record straight!

Kai-Yan Liu, Xiao-Bing Li

Specialty type: Infectious diseases

Provenance and peer review:
Invited article; Externally peer reviewed.

Peer-review model: Single blind

Peer-review report's classification

Scientific Quality: Grade B, Grade C

Novelty: Grade B, Grade C

Creativity or Innovation: Grade C, Grade C

Scientific Significance: Grade B, Grade C

P-Reviewer: Gezh SAS

Received: March 11, 2025

Revised: March 27, 2025

Accepted: April 7, 2025

Published online: July 26, 2025

Processing time: 47 Days and 3.9 Hours



Kai-Yan Liu, Department of Urology, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China

Xiao-Bing Li, Department of Thoracic Oncology, Hubei Cancer Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430079, Hubei Province, China

Corresponding author: Xiao-Bing Li, MD, PhD, Assistant Professor, Department of Thoracic Oncology, Hubei Cancer Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, No. 116 South Zhuodaquan Road, Hongshan District, Wuhan 430079, Hubei Province, China. lixiaobing0629@126.com

Abstract

Pleural effusion, characterized by the accumulation of fluid in the pleural space, poses significant challenges in clinical practice, especially in determining whether it belongs to the inflammatory exudates or non-inflammatory transudates. Adenosine deaminase (ADA), an enzyme primarily produced by immune cells, particularly lymphocytes, increase in response to inflammatory conditions, including tuberculosis and malignancies. Elevated ADA levels in pleural have been shown to correlate with inflammatory exudates, making it a valuable biomarker for differentiating between inflammatory and non-inflammatory effusions. Moreover, numerous studies have demonstrated the treatment function of ADA in inflammation-related pleural effusion syndrome. Recently, research has established the values for the implication of ADA in diagnosing and managing pleural disease. Based on these findings, ADA becomes a reliable, non-invasive marker for early diagnosis and the appropriate treatment for pleural inflammation, ultimately improving patient outcomes.

Key Words: Pleural effusion; Pleural inflammation; Diagnosis; Biomarker; Adenosine deaminase

©The Author(s) 2025. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

ANEXO 5 – EDITORIAL REFERENTE AO ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 2

Liu KY *et al.* ADA detection for pleural effusions

Core Tip: Pleural effusion, characterized by the accumulation of fluid in the pleural space, poses significant challenges in clinical practice, particularly in distinguishing inflammatory exudates from non-inflammatory transudates. Adenosine deaminase (ADA), an enzyme primarily produced by immune cells, especially lymphocytes, increase in response to inflammatory conditions, including infections such as tuberculosis and malignancies. Elevated ADA levels in pleural have been shown to correlate with inflammatory exudates, making it a valuable biomarker for differentiating between inflammatory and non-inflammatory effusions. Moreover, numerous studies have demonstrated the utility of ADA in inflammation-related pleural effusion syndrome. Recent research has established reference values for the implication of ADA in diagnosing and managing pleural disease. Based on these findings, ADA becomes a reliable, non-invasive marker for early diagnosis and the appropriate treatment of pleural inflammation, ultimately improving patient outcomes.

Citation: Liu KY, Li XB. Tired of the confusion around pleural effusions: Adenosine deaminase detection sets the record straight! *World J Clin Cases* 2025; 13(21): 106945
URL: <https://www.wjgnet.com/2307-8960/full/v13/i21/106945.htm>
DOI: <https://dx.doi.org/10.12998/wjcc.v13.i21.106945>

INTRODUCTION

The etiology and diagnosis of pleural effusion syndrome remain significant challenges in clinical practice, particularly in distinguishing inflammatory exudates from non-inflammatory transudates[1,2]. Traditional diagnostic methods rely on elevated pleural fluid protein and lactate dehydrogenase (LDH) levels. However, the limited sensitivity and specificity restrict their clinical implication[3,4]. In recent years, adenosine deaminase (ADA), an enzyme closely related to immune responses, has gained increasingly attention for its diagnostic potential in pleural fluid[5,6]. Recently, Maranhão *et al*[7] conducted a study in Brazil and globally to evaluate the ADA as a biomarker for diagnosing the inflammatory pleural effusion. The study enrolled 157 confirmed pleural effusion patients, including 124 with exudates and 33 with transudates. Patients included in this study were required to undergo thoracentesis or thoracoscopy. The diagnosis of pleural effusion was established based on the criteria defined by Maranhão and Silva Junior, with adjustments made to the total protein and total LDH levels in the pleural fluid. Exclusion criteria comprises absolute contraindications or inability to undergo thoracentesis or thoracoscopy, hemolysis in the pleural fluid, chronic renal failure, jaundice, unknown causes of pleural effusion syndrome, and the use of immunosuppressive drugs[8,9]. Receiver operating characteristic curve analysis was performed to determine the optimal cutoff value for P-ADA.

The study strictly follows STARD and STROBE guidelines to ensure methodological rigor and transparency in data reporting. Sample size calculation was based on an expected AUC > 0.50. For statistical analysis, non-parametric tests (*e.g.*, Mann-Whitney *U* test) and multiple comparison corrections (Dunn's test) were employed, considering the non-normal distribution of the data and strengthening the scientific validity of the analysis (Table 1).

IMPORTANT DISCOVERIES

The study found that the P-ADA value was significantly different between inflammatory and non-inflammatory pleural effusions[10,11], with an optimal cutoff of ≥ 9.00 U/L. This method exhibited a sensitivity of 77.69%, a specificity of 68.75%, a positive predictive value (PPV) of 90.38%, and an AUC of 0.8107 (Table 2). Despite the moderate specificity, the high sensitivity and superior PPV underscore its clinical significance in diagnosing inflammatory pleural effusion[12]. Furthermore, the study demonstrated that the elevation of P-ADA levels may reflect the diverse causes of inflammatory pleural effusion, such as tuberculous pleuritis, cancerous pleuritis. Patients with tuberculous pleural effusion showed a median P-ADA increase of 42.0 U/L, while an extremely high P-ADA level of 401.2 U/L was observed in lymphoma patients, suggesting that markedly elevated P-ADA levels may indicate malignancy. Additionally, the P-ADA level was significantly lower in transudates compared to exudates (6.85 U/L vs 18.4 U/L, $P < 0.0001$), confirming the role of ADA in differentiating between inflammatory and non-inflammatory responses (Table 3). Regarding mechanism, the authors described the pathological basis of ADA from an immunological perspective, emphasizing the key role of the ADA-2 isoenzyme in monocyte-macrophage activation[13,14]. This mechanistic insight provides theoretical support for P-ADA as a biomarker[15].

ADVANTAGES AND EXISTED PROBLEMS

The study validated the role and value of detecting ADA levels in diagnosing inflammatory pleural effusion, emphasizing its clinical application, detection methodology, and regional representativeness[16]. First, the proposed cutoff value (≥ 9.00 U/L) is much lower than the traditional threshold for tuberculous pleural effusion (≥ 30 U/L), thereby broadening the clinical applicability of P-ADA, especially for early-stage inflammatory screening. Second, the cutoff value was determined using the Youden index, and the model's discriminatory power was evaluated using the Hosmer-

ANEXO 5 – EDITORIAL REFERENTE AO ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 2

Liu KY et al. ADA detection for pleural effusions

Table 1 Basic study information

Item	Content
Study type	Retrospective cohort study
Objective	To evaluate the diagnostic performance of P-ADA as a biomarker for inflammatory pleural diseases
Sample size	157 patients (exudates: 124 cases; transudates: 33 cases)
Key methods	ROC curve analysis to determine optimal P-ADA cutoff; diagnostic parameters evaluated using Youden's index
Main conclusion	P-ADA ≥ 9.00 U/L demonstrates high diagnostic performance for inflammatory pleural effusions (AUC = 0.81, sensitivity = 77.69%)

AUC: Area under the curve; P-ADA: Pleural adenosine deaminase; ROC: Receiver operating characteristic.

Table 2 Diagnostic performance parameters (Receiver operating characteristic curve analysis)

Parameter	Result, %	95%CI
Optimal cutoff (U/L)	≥ 9.00	-
Sensitivity	77.69	69.22-84.75
Specificity	68.75	49.99-83.88
Positive predictive value	90.38	83.05-95.29
Negative predictive value	44.90	30.67-59.77
AUC value	81.07	0.7174-0.8754
Diagnostic accuracy	75.82	68.24-82.37

AUC: Area under the curve.

Table 3 Distribution of pleural effusion etiologies

Etiology category	n (%)	Notes
Transudates (Non-inflammatory)	33 (21)	Congestive heart failure (26 cases), cirrhosis (3 cases), etc.
Exudates (Inflammatory)	124 (79)	Tuberculous effusion (44 cases), adenocarcinoma (37 cases), etc.
Other notable etiologies	-	Empyema (8 cases), lymphoma (7 cases), etc.

Lemeshow test, ensuring the robustness of the results[17]. In terms of regional representativeness, since the study was initially conducted in Brazil, it provides region-specific data for pleural effusion diagnosis in areas with a high burden of tuberculosis, highlighting its public health significance[18,19].

Despite the advantages, the study has several limitations. For instance, the retrospective study design may bring a selection bias (e.g., including cases with complete data only) and an inability to control for confounding factors (e.g., comorbid infections or medication history). Also, the research was conducted at a single center, the population characteristics, such as age and etiology distribution may affect the generalizability of the results. Likewise, 79% of transudates were attributed to congestive heart failure, with fewer cases of other causes (e.g., cirrhosis), potentially underestimating P-ADA's performance in non-cardiogenic pleural effusions. Additionally, although the authors emphasized that the cutoff value was based on statistical optimization, significant differences in P-ADA levels across different etiologies (e.g., tuberculosis vs. lymphoma) suggest that a single threshold may not be universally applicable across all clinical scenarios [20,21].

To address these issues, the following strategies can be implemented for targeted improvement[22,23]. A stratified diagnostic approach, which combines P-ADA levels with etiological features to establish stratified diagnostic thresholds, is recommended. For example, a threshold of ≥ 9 U/L can be used for initial screening of inflammatory pleural effusion, while levels ≥ 150 U/L should prompt investigation into lymphoma or complex infection. Additionally, rather than relying on single biomarker, combining multiple parameters can enhance diagnostic accuracy[24,25]. This could be achieved by integrating P-ADA value with cytokines (such as interleukin-6), microbiological tests, or imaging techniques [26]. Lastly, given the limitations of a single-center retrospective study, conducting multi-center prospective clinical studies is crucial to determine detection cutoff values and promote the widespread use of P-ADA level testing in regions with limited healthcare resources[27,28].

ANEXO 5 – EDITORIAL REFERENTE AO ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 2

Liu KY *et al.* ADA detection for pleural effusions

CONCLUSION

To summarize, this study systematically demonstrated the P-ADA exhibits high sensitivity in diagnosing of inflammatory pleural effusion and shows positive predication value[28,29], offering a practical tool for clinicians[30]. Despite the inherent limitations of a retrospective design, the methodological rigor and biological plausibility of the data provide high confidence in the findings[31]. Future research should focus on refining the cutoff value strategy and exploring its potential applications in personalized medicine, ultimately achieving precise diagnosis and early intervention of pleural effusion etiology[32].

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Xi-Chen Wang (MSD China, Shanghai, China) for providing academic information consulting support.

FOOTNOTES

Author contributions: Liu KY contributed to drafting manuscripts; Li XB contributed to collect, analyze, and summarize the literature.

Conflict-of-interest statement: All author declares that there are no conflicts of interest in this manuscript.

Open Access: This article is an open-access article that was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution NonCommercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Country of origin: China

ORCID number: Xiao-Bing Li 0000-0002-3332-0575.

S-Editor: Liu JH

L-Editor: A

P-Editor: Zhang L

REFERENCES

- Foley SP, Parrish JS. Pleural Space Infections. *Life (Basel)* 2023; **13**: 376 [PMID: 36836732 DOI: 10.3390/13020376]
- Kaagaard MD, Matos LO, Evangelista MVP, Wegener A, Holm AE, Vestergaard LS, Do Valle SCN, Silvestre OM, Lacerda MVG, de Souza RM, Barreto Dos Santos F, Biering-Sørensen T, Brainin P. Frequency of pleural effusion in dengue patients by severity, age and imaging modality: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2023; **23**: 327 [PMID: 37189054 DOI: 10.1186/s12879-023-08311-y]
- AbdulGaffar B, Farhan R, Dutta P. Acute monoclonal myeloid leukemic pleural effusion: Pitfalls and clues. *Diagn Cytopathol* 2023; **51**: E59-E64 [PMID: 36308418 DOI: 10.1002/dc.25068]
- Correia RDS, Leal-Calvo T, Mafort TT, Santos AP, Leung J, Pinheiro RO, Rufino R, Moraes MO, Rodrigues LS. Reanalysis and validation of the transcriptional pleural fluid signature in pleural tuberculosis. *Front Immunol* 2023; **14**: 1256558 [PMID: 38288122 DOI: 10.3389/fimmu.2023.1256558]
- Gao L, Wang W, Zhang Y, Hu X, An J, Li Y, Chen M, Shen Y. Adenosine deaminase-based measurement in the differential diagnosis of pleural effusion: a multicenter retrospective study. *Ther Adv Respir Dis* 2023; **17**: 17534666231155747 [PMID: 36846945 DOI: 10.1177/17534666231155747]
- Li Z, Chen J, Zeng J, Shi P, Xiong X, Wang M, Zheng D, Zhao R, Dong L. Application of Adenosine Deaminase and γ -Interferon Release Assay in Pleural Fluid for the Diagnosis of Tuberculous Pleural Effusion in Patients Over 40 Years Old. *Infect Drug Resist* 2023; **16**: 1009-1018 [PMID: 36824067 DOI: 10.2147/IDR.S400838]
- Maranhão BHF, Junior CTDS, Barillo JL, Souza JBS, Silva PS, Stiebulov R. Total adenosine deaminase cases as an inflammatory biomarker of pleural effusion syndrome. *World J Clin Cases* 2025; **13**: 101850 [DOI: 10.12998/wjcc.v13.i19.101850]
- Botana Rial M, Pérez Pallarés J, Cases Viedma E, López González FJ, Porcel JM, Rodríguez M, Romero Romero B, Valdés Cuadrado L, Villena Garrido V, Cordovilla Pérez R. Diagnosis and Treatment of Pleural Effusion. Recommendations of the Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery. Update 2022. *Arch Bronconeumol* 2023; **59**: 27-35 [PMID: 36273933 DOI: 10.1016/j.arbres.2022.09.017]
- Chen H, Zhang Y, Zheng J, Shi L, He Y, Niu Y, Lei J, Zhao Y, Xia H, Chen T. Application of mNGS in the Etiological Diagnosis of Thoracic and Abdominal Infection in Patients With End-Stage Liver Disease. *Front Cell Infect Microbiol* 2021; **11**: 741220 [PMID: 35071029 DOI: 10.3389/fcimb.2021.741220]
- Huang J, Guo L, Kang HW, Lv D, Lin W, Li CF, Huang XQ, Ding QL. Nicotinamide phosphoribosyltransferase as a biomarker for the diagnosis of infectious pleural effusions. *Sci Rep* 2021; **11**: 21121 [PMID: 34702907 DOI: 10.1038/s41598-021-00653-4]
- Yang X, Yan J, Xue Y, Sun Q, Zhang Y, Guo R, Wang C, Li X, Liang Q, Wu H, Wang C, Liao X, Long S, Zheng M, Wei R, Zhang H, Liu Y, Che N, Liu LDW, Pan J, Wang G, Wang Y. Single-cell profiling reveals distinct immune response landscapes in tuberculous pleural effusion

ANEXO 5 – EDITORIAL REFERENTE AO ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO – 2

Liu KY et al. ADA detection for pleural effusions

- and non-TPE. *Front Immunol* 2023; **14**: 1191357 [PMID: 37435066 DOI: 10.3389/fimmu.2023.1191357]
- 12 Pandie S, Peter JG, Kerbelker ZS, Meldau R, Theron G, Govender U, Ntsheke M, Dheda K, Mayosi BM. Diagnostic accuracy of quantitative PCR (Xpert MTB/RIF) for tuberculous pericarditis compared to adenosine deaminase and unstimulated interferon- γ in a high burden setting: a prospective study. *BMC Med* 2014; **12**: 101 [PMID: 24942470 DOI: 10.1186/1741-7015-12-101]
 - 13 de Reuver R, Macfarr J. Novel insights into double-stranded RNA-mediated immunopathology. *Nat Rev Immunol* 2024; **24**: 235-249 [PMID: 37752355 DOI: 10.1038/s41577-023-00940-3]
 - 14 Dorsey MJ, Rubinstein A, Lehman H, Fausnight T, Wiley JM, Haddad E. PEGylated Recombinant Adenosine Deaminase Maintains Detoxification and Lymphocyte Counts in Patients with ADA-SCID. *J Clin Immunol* 2023; **43**: 951-964 [PMID: 36840835 DOI: 10.1007/s10875-022-01426-y]
 - 15 Zhao-Wei Gao, Lan Yang, Chong Liu, Xi Wang, Wen-Tao Gao, Hui-Zhong Zhang, Ke Dong. Distinct Roles of Adenosine Deaminase Isoenzymes ADA1 and ADA2: A Pan-Cancer Analysis. *Front Immunol* 2022; **13**: 903461 [PMID: 35663977 DOI: 10.3389/fimmu.2022.903461]
 - 16 Núñez-Jurado D, Rodríguez-Martín I, Guerrero JM, Santotribio JD. LDH/ADA ratio in pleural fluid for the diagnosis of infectious pleurisy. *Clin Exp Med* 2023; **23**: 5201-5213 [PMID: 37747590 DOI: 10.1007/s10238-023-01194-y]
 - 17 Shimoda M, Tanaka Y, Morimoto K, Yoshiyama T, Yoshimori K, Ohta K. Diagnostic flowchart for tuberculous pleurisy, pleural infection, and malignant pleural effusion. *Respir Invest* 2024; **62**: 157-163 [PMID: 38141528 DOI: 10.1016/j.resinv.2023.11.005]
 - 18 Wen XH, Wen JX, Mu L, Cao XS, Yan L, Huang JH, Chen H, Jiang TW, Hu ZD, Niu Y, Zheng WQ. Pleural fluid soluble Fas ligand and tuberculous pleural effusion: a prospective diagnostic test accuracy study. *J Thorac Dis* 2023; **15**: 6493-6501 [PMID: 38249869 DOI: 10.21037/jtd-23-1076]
 - 19 Antas P, Borchert J, Ponte C, Lima J, Georg I, Bastos M, Truijman A. Interleukin-6 and -27 as potential novel biomarkers for human pleural tuberculosis regardless of the immunological status. *Microbes Infect* 2024; **26**: 105238 [PMID: 37805123 DOI: 10.1016/j.micinf.2023.105238]
 - 20 Zheng SC, Huang ZY, Zhai K, Shi HZ, Shao MM. Hepatocyte growth factor combined with adenosine deaminase as biomarker for diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Front Microbiol* 2023; **14**: 1181912 [PMID: 37485530 DOI: 10.3389/fmicb.2023.1181912]
 - 21 Bajpai J, Roy S, Shukla S, Pradhan A, Kant S, Shah S. Detection of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis in pericardial fluid culture and its correlation with cartridge based nucleic acid amplification test and adenosine deaminase activity. *Indian J Tuberc* 2024; **71** Suppl 1: S59-S66 [PMID: 39067957 DOI: 10.1016/j.ijtb.2023.09.014]
 - 22 Fei G, Yijun M, Weijiang J, Huimin C, Fang L. Biomarkers for distinguishing tuberculous pleural effusion from non-tuberculous effusion: a retrospective study. *BMC Infect Dis* 2023; **23**: 771 [PMID: 37940833 DOI: 10.1186/s12879-023-08781-0]
 - 23 Amacher V, Bode PK, Moch H, Lenggenhager D, Vrugt B. Utility of BAP1, p16, and Methylthio-Adenosine Phosphorylase Immunohistochemistry in Cytological and Histological Samples of Pleural Mesotheliomas. *Acta Cytol* 2023; **67**: 444-450 [PMID: 36889303 DOI: 10.1159/000530002]
 - 24 Liu Y, Liang Z, Yang J, Yuan S, Wang S, Huang W, Wu A. Diagnostic and comparative performance for the prediction of tuberculous pleural effusion using machine learning algorithms. *Int J Med Inform* 2024; **182**: 105320 [PMID: 38118260 DOI: 10.1016/j.ijmedinf.2023.105320]
 - 25 Bodawi EO, Kanellakis NI, Corcoran JP, Zhao Y, Hassan M, Asciak R, Mercer RM, Sundaralingam A, Addala DN, Miller RF, Dong T, Condliffe AM, Rahman NM. The Biological Role of Pleural Fluid PAI-1 and Sonographic Septations in Pleural Infection: Analysis of a Prospectively Collected Clinical Outcome Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2023; **207**: 731-739 [PMID: 36191254 DOI: 10.1164/rccm.202206-1084OC]
 - 26 Cao XS, Zheng WQ, Hu ZD. Diagnostic value of soluble biomarkers for parapneumonic pleural effusion. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2023; **60**: 233-247 [PMID: 36593742 DOI: 10.1080/10408363.2022.2158779]
 - 27 Rabbi MF, Ahmed MN, Patowary MSA, Haq SR, Razzaque SMA, Arafat HM, Nahar T, Ikhtidar MA. Pleural fluid adenosine deaminase to serum C-reactive protein ratio for diagnosing tuberculous pleural effusion. *BMC Pulm Med* 2023; **23**: 349 [PMID: 37715196 DOI: 10.1186/s12890-023-02644-9]
 - 28 Fan F, Lv J, Yang Q, Jiang F. Clinical characteristics and serum inflammatory markers of community-acquired mycoplasma pneumoniae in children. *Clin Respir J* 2023; **17**: 607-617 [PMID: 37142438 DOI: 10.1111/crj.13620]
 - 29 Abdullelah M, Abu Hishmeh M. Infective Pleural Effusions-A Comprehensive Narrative Review Article. *Clin Pract* 2024; **14**: 870-881 [PMID: 38804400 DOI: 10.3390/clinpract14030068]
 - 30 Jeon DS, Kim SH, Lee JH, Choi CM, Park HJ. Conditional diagnostic accuracy according to inflammation status and age for diagnosing tuberculous effusion. *BMC Pulm Med* 2023; **23**: 400 [PMID: 37864205 DOI: 10.1186/s12890-023-02700-4]
 - 31 Kacwinnud J, Pienchitertkajorn S, Koomtanapat K, Lumkul L, Wongyikul P, Phaiyo P. Diagnostic scoring systems for tuberculous pleural effusion in patients with lymphocyte-predominant exudative pleural profile: A development study. *Heliyon* 2024; **10**: e23440 [PMID: 38332886 DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e23440]
 - 32 Tang H, Hu X, Li L, Deng S, Jiang Y, Luo L, Cai R, Yang Y, Wu C, Gong X, Feng J. Complement regulatory proteins: Candidate biomarkers in differentiating tuberculosis pleural effusion. *Front Immunol* 2023; **14**: 1073884 [PMID: 36820087 DOI: 10.3389/fimmu.2023.1073884]

ANEXO 6 – ARTIGO ORIGINAL 3 (COMPROVANTE DE ACEITE)

----- Mensagem Original -----
De: Artigos Brasileiros de Ciências e Saúde
Para: ctsilvajunior
Data: Monday, 06 De October De 2025 11:24
Assunto: RE: Original article

Prezado Dr. Cyro Teixeira da Silva Junior

Primeiramente, peço por gentileza mencionar o código 2024-034 referente ao seu manuscrito em todas as comunicações com a revista.

Informo que o seu artigo foi aceito para publicação e a previsão para ser publicado será até dezembro de 2025. Antes da publicação, os autores receberão o texto para possíveis ajustes.

Att,
 Ana Costa
 ABCS Health Sciences (eISSN 2357-8114)
 Escritório Editorial - Secretária
abcs@fmabc.br

Artigo original 3 (prova para autores)

Disponível em <https://www.portalnepas.org.br/abcs/issue/view/117>

DOI: <https://doi.org/10.7322/abcs/2024034.2743>

2024-034 – Estágio: prova para autores

ORIGINAL ARTICLE

Received: Mar 05, 2024

Revised: Nov 30, 2024

Approved: Jan 14, 2025

Diagnostic utility of total adenosine deaminase as a biomarker in patients with transudates from pleural effusion syndrome

Bernardo Henrique Ferraz Maranhão¹, Cyro Teixeira da Silva Junior², Jorge Luiz Barillo³, Joeber Bernardo Soares de Souza⁴, Patricia Siqueira Silva⁴, Roberto Stirbulov⁵

¹Departamento de Medicina, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) – Rio de Janeiro (RJ), Brazil

²Departamento de Clínicas, Laboratório de Ensino e Pesquisa em Pleurologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense (UFF) – Niterói (RJ), Brazil

³Hospital Geral Santa Teresa (HST) – Petrópolis (RJ), Brazil

⁴Centro de Pesquisa e Assistência em Tuberculose, Universidade Federal Fluminense (UFF) – Niterói (RJ), Brazil

⁵Departamento de Clínicas, Faculdade de Ciências Médicas, Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (FCMSCSP) - São Paulo (SP), Brazil

Corresponding author: Cyro Teixeira da Silva Junior, Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense - Rua Des. Athayde Parreiras, 100 – Fátima – CEP: 24070-090 – Niterói (RJ), Brazil - E-mail: ctsilvajunior@predialnet.com.br

ANEXO 6 – ARTIGO ORIGINAL 3 (PROVA PRÉ IMPRESSÃO)

2024-034 – Estágio: prova para autores

ABSTRACT

Introduction: Accurately identifying pleural fluid as either transudate or exudate is critical. P-ADA, or the total pleural adenosine deaminase enzyme, is a reliable biomarker for distinguishing between transudates and exudates. **Objective:** This study aimed to identify P-ADA diagnostic parameters for pleural transudate diagnosis by establishing a cutoff value using the receiver operating characteristic curve. **Methods:** The P-ADA assay was performed using a kinetic technique. The performance of the model was evaluated using the area under the receiver operating characteristic curve (AUC-ROC) and diagnostic parameters. The ideal cutoff value for P-ADA in pleural transudates was determined using the Youden index in the ROC curve. **Results:** A total of 157 patients with exudative pleural effusion (n=124, 79%) and transudative pleural effusion (n=33, 21%) were included in this observational retrospective cohort study. The optimal cutoff value of P-ADA was ≤ 8.21 U/L. The diagnostic parameters as sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, positive and negative likelihood values, odds ratio, and accuracy were 66.0 (95% CI, 0.48-0.82); 81.0 (95% CI, 0.73-0.87); 48.0 and 90.0 (95% CI, 0.33-0.64; 0.83-0.94); 4.9 and 0.56 (95%CI, 2.21-11.2; 0.39-0.82); 8.78 (95%CI, 0.78-18.34), and 78.0 (95%CI, 0.80-0.91), respectively (chi-square=29.51, p=0.00001). The AUC was 0.8203 (95% CI, 0.7270-0.8838); SE, 0.0393; Z-value to test, 8.157; p=0.0000. An AUC >0.75 was clinically useful. The Hosmer-Lemeshow test showed excellent discrimination. **Conclusion:** P-ADA levels can be used to obtain reliable diagnostic and predictive parameters for discriminating between transudative and exudative pleural effusions.

Keywords: pleural effusion; biomarkers; adenosine deaminase; extracellular fluid; cross-sectional studies; Indicators (Statistics).

ANEXO 6 – ARTIGO ORIGINAL 3 (PROVA PRÉ IMPRESSÃO)

2024-034 – Estágio: prova para autores

INTRODUCTION

Identifying whether a pleural effusion syndrome (PES) is an exudate or a transudate is the first step in determining the etiology¹. A transudative pleural effusion usually represents an outward sign of disease in another organ. So, the main causes are renal, hepatic, and cardiac disorders^{2,3}.

Adenosine deaminase (ADA) is an important enzyme in the purine salvage pathway. In humans, ADA has two isoforms, ADA1 and ADA2. ADA1 is found in all human tissues. It is highly expressed by T and B cells and accounts for approximately 90% of total ADA activity. The primary role of ADA1 is to regulate intracellular adenosine levels. ADA2 has autocrine activity, induces monocyte proliferation, and aids in the differentiation of anti-inflammatory macrophages (M2)⁴.

The total pleural adenosine deaminase (P-ADA, U/L; enzyme code, 3.5.4.4) is a reliable biomarker for distinguishing between exudates and transudates⁵⁻⁷. The “gold standard” for diagnosing exudates and transudates, because of their high sensitivity, is the criterion of Light et al.². This distinction determines the differential diagnosis, therapeutic management, and pathophysiologic mechanisms that lead to the increase of fluid in the pleural cavity.

Pleural exudate occurs when the permeability of the mesothelial-microvascular/capillary barrier to macromolecules is elevated. In addition, other mechanisms are involved, such as impairment of lymphatic drainage. The pleural exudates have their origin from an obstruction in the lymphatic system, including the stomas, thoracic duct, or mediastinal lymph nodes, caused by fibrosis, malignancy, lymphatic dysfunction, as in yellow nail syndrome or lymphangioleiomyomatosis, and fibrin deposition in the later stages of a parapneumonic pleural effusion⁸. The presence of a transudate indicates that the systemic or pulmonary pressures are influencing the formation or reabsorption of pleural fluid. Therefore, the barrier permeability characteristics are maintained for transudates, and the transpleural

ANEXO 6 – ARTIGO ORIGINAL 3 (PROVA PRÉ IMPRESSÃO)

2024-034 – Estágio: prova para autores

transport of macromolecules is the same as that under physiological conditions^{8,9}. However, to the best of our knowledge, no research has been published on a P-ADA-based cutoff criterion for transudative pleural effusion.

This study was conducted to determine the P-ADA classification threshold for pleural transudates using receiver operating characteristic (ROC) curve analysis with a nonparametric approach and Youden index criterion.

METHODS

Design

The STARD and STROBE recommendations were followed in the study design, findings, and reporting^{10,11}. Our investigation was a traditional observational, retrospective cohort analysis performed at two hospitals in Rio de Janeiro, Brazil, between March 2015 and December 2019.

Ethics approval

Ethical approval for this study has been accepted by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Federal Fluminense University under number 48946121.9.0000.5243.

Inclusion and exclusion criteria

Clinical and imaging evaluations were performed to confirm the causative diagnosis of PES¹. An initial thoracentesis procedure was performed, followed by a video-assisted thoracoscopic surgery (VATS) and a histopathological analysis if necessary¹. Laboratory evaluations of pleural fluids, such as P-ADA paired with other disease biomarkers, were also performed. The diagnosis of transudate was confirmed using the Maranhão and Silva Junior

ANEXO 6 – ARTIGO ORIGINAL 3 (PROVA PRÉ IMPRESSÃO)

2024-034 – Estágio: prova para autores

criterion³. This criterion was validated according to Light's criterion but with dosages of total protein and total lactate dehydrogenase (LDH) only in pleural fluid^{2,3}.

The adequate collection, storage, and processing of the pleural fluids were observed for an accurate diagnosis¹². The exclusion criteria were absolute contraindications or refusal to undergo thoracentesis or VATS; use of immunosuppressive medications; hemolysis in pleural liquids; jaundice; chronic renal failure because ADA is inhibited by urea; HIV infection; use of drugs such as allopurinol, diuretics, acyclovir, aspirin, or diclofenac; and pleural effusion of unknown cause¹³⁻¹⁵.

P-ADA assay

A commercial kit was used to perform the P-ADA assay using a kinetic approach. Briefly, the P-ADA assay is based on the enzymatic deamination of adenosine to inosine, which is converted to hypoxanthine by purine nucleoside phosphorylase. Hypoxanthine is transformed to uric acid and hydrogen peroxide by xanthine oxidase. Hydrogen peroxide reacted with N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline and 4-aminoantipyrine (4-AA) in the presence of peroxidase to generate quinone dye, which is measured in a kinetic manner. One unit of P-ADA was defined as the amount of ADA that generates one μ mole of inosine from adenosine per minute at 37 °C. The assay was linear from 0-200 U/L ($r^2 > 0.99$). ADA was stable for one week at 4 °C. The reagents were stable for one year if stored at 2–8 °C in amber flasks. ADA activity in the serum of healthy humans has a reference value range of 0–15 U/L¹⁶.

Statistical approach

Descriptive and inferential statistics, including ROC curve analysis, were produced using the statistical tools NCSS version 2022, GraphPad version 5.0, and MedCalc version 20.11. The Grubbs double-sided method, which examines the most extreme values on both

ANEXO 6 – ARTIGO ORIGINAL 3 (PROVA PRÉ IMPRESSÃO)

2024-034 – Estágio: prova para autores

sides of the data, was used to detect outliers. The normality and variance homogeneity of the data were evaluated using the Shapiro-Wilk test (W). The median and interquartile range were used to express non-normal distributions. When the sample was not normally distributed, the Wilcoxon-Mann-Whitney U test was used to compare data. The t-test, a parametric test of difference, was used when our data were independent and normally distributed. The chi-square test was used to compare the groups and proportions. The two-sided p-value was 0.05.

Sample size

The sample size calculation was based on the expected area under the ROC curve ($AUC > 0.50$), null value of the AUC ($AUC = 0.50$), and ratio of sample sizes between positive and negative cases ($n=2$) according to the MedCalc software¹⁷. For an α -level of 0.05 and a β -level of 0.20 (statistical power = 80%), a sample of 19 cases was required in the positive group (transudates) and 38 in the negative group (exudates or controls), giving a total of 57 cases. The sample size in this study consisted of 157 pleural fluid samples from 157 patients with proven transudative ($n=33$) and exudative pleural effusion ($n=124$).

Optimal P-ADA threshold

The nonparametric technique of DeLong et al.¹⁸ was used to analyze the ROC curve of P-ADA for the diagnosis of transudates. The Youden index was used to determine the optimal P-ADA threshold (J). The J value is the highest sum of the sensitivity and specificity¹⁹. Pearson's chi-square test was also used to determine the relationship or association between the transudate and the P-ADA cutoff value²⁰.

Model performance, discrimination, and potential clinical usefulness

ANEXO 6 – ARTIGO ORIGINAL 3 (PROVA PRÉ IMPRESSÃO)

2024-034 – Estágio: prova para autores

Model performance refers to how well a statistical model fits the data used to build it. It was evaluated using metrics such as AUC-ROC, diagnostic parameters with 95% confidence intervals, and Cohen's kappa coefficient according to the Landis and Koch guidelines^{10,21}.

Discrimination refers to the ability of a biomarker to distinguish between individuals with or without a disease or condition. Discrimination was classically evaluated using AUC-ROC (C-statistic) with a 95% confidence interval (CI)²²⁻²⁴. Hosmer and Lemeshow proposed the following classifications as a general rule for the discrimination accuracy of a logistic regression model based on the AUC space: excellent discrimination (0.90-1.0), very good discrimination (0.80-0.90), good discrimination (0.70-0.80), sufficient discrimination (0.60-0.70), poor discrimination (0.50-0.60), and biomarker not useful (0.00-0.50)²².

Clinical usefulness refers to whether a biomarker has practical utility in a clinical setting, such as helping to diagnose a disease, predicting disease progression, or guiding treatment decisions. Potential clinical usefulness can be evaluated using the AUC or clinical utility index (CUI) for diagnostic biomarkers²⁵. In general, an AUC >0.75 is clinically useful²⁶.

RESULTS

Demographic characteristics and causes of pleural exudates and transudates

The 157 cases of pleural exudates and transudates were represented by demographic information and laboratory analyses (Table 1). Exudates were more common than transudates [124 (79 %) vs. 33 (21 %) patients]. The transudate cases included twenty-six patients with congestive heart failure, three patients with cirrhosis of the liver and ascites, three with acute renal failure, and one patient with low total protein levels. This last patient was diagnosed as pure transudate because they had other pleural biomarkers, such as a total nucleated cell count of fewer than 1000 cells per mm³ and extrathoracic ultrasonography compatible with transudate^{1,27}. The exudates included 44 cases of tuberculosis, 37 cases of adenocarcinoma, 15

ANEXO 6 – ARTIGO ORIGINAL 3 (PROVA PRÉ IMPRESSÃO)

2024-034 – Estágio: prova para autores

cases of simple parapneumonic effusions, 8 cases of complicated parapneumonic effusions/empyema, 7 cases of lymphoma, 7 cases of squamous cell carcinoma, and 6 cases of other exudates, which included patients with confirmed diagnoses of pseudo-Meigs' syndrome (n=1), Dressler's syndrome (n=3), chylothorax (n=1), and leukemia (n=1).

Adenosine deaminase analysis in pleural exudates and transudates

The pattern of missing data was MAR, or missing at random. Only 3% of exudates and 6% of transudates had missing P-ADA values. For the exudate of a patient with lymphoma, the Grubbs test yielded an outlier value of 1121.1 U/L of P-ADA. There were no digitization errors, and this value was consistent with the causative diagnosis. However, a median of 18.4 U/L was used instead of this result.

The median values of P-ADA were significantly different ($U=679.5$; $p<0.0001$) between exudates (18.4 U/L, IQR, 9.85 – 41.4) and transudates (6.85 U/L, IQR, 2.67 – 11.26). Regarding male sex, there was no significant difference in the proportion, as calculated by the chi-square test, between exudates and transudates ($p=0.9415$). The same was observed for the female sex in both groups ($p=0.9416$). Regarding age, there was a significant difference in the medians ($U=895$, $p<0.0001$) between exudates (58.0; IQR, 41.5 – 73.5) and transudates (76.0; IQR, 63.0 – 86.25).

The values of total proteins and total LDH in the pleural fluid were in agreement with the Light et al.² and Maranhão-Silva Junior³ criteria (Table 1). Figure 1 shows the ROC curve obtained using the method described by DeLong et al.¹⁸. For diagnostic purposes with transudates, according to the Youden index ($J=0.4812$; distance to the ROC curve corner = 0.3815), the optimal cutoff value was ≤ 8.21 U/L of P-ADA. For discrimination of the model, there was an AUC of 0.8203, a 95% CI of 0.7270-0.8838, an SE of 0.0393, and a Z-value to test of 8.157 with a two-sided p value of 0.0000. Each point on the ROC curve represents a

ANEXO 6 – ARTIGO ORIGINAL 3 (PROVA PRÉ IMPRESSÃO)

2024-034 – Estágio: prova para autores

sensitivity/specificity pair corresponding to a particular cutoff point (Figure 1). The percentage agreement between a confirmed diagnosis of transudate using the inclusion criteria and the ideal cutoff point was 78%. Cohen's kappa coefficient had moderate agreement ($k=0.4245$) according to the Landis and Koch guidelines²¹. To check another performance of the model, Table 2 was created with the diagnostic parameters for P-ADA, with the best cutoff point selected for pleural transudates.

DISCUSSION

This study aimed to evaluate the diagnostic parameters of P-ADA as a biomarker for pleural transudates. AUC is currently used in medical research to evaluate the performance of diagnostic biomarkers²²⁻²⁴.

In our results, P-ADA values were absent in only 3% of exudates and 6% of transudates. The diagnostic parameters did not change significantly when less than 10% of the data were missing²⁸.

The sex and median age were comparable to those reported in earlier studies^{3,5}. P-ADA level was statistically significant in separating pleural transudates and exudates, according to Table 1 and other studies⁵⁻⁷. The median P-ADA levels were significantly lower in transudates (6.85 U/L) than in exudates (18.4 U/L). The explanation for these findings is that a transudate, as opposed to an exudate, indicates that the pleural mesothelium is affected by systemic and/or pulmonary pressures. The barrier permeability characteristics were maintained. ADA has a low molecular radius of 29.10 angstroms and a weight of 42 kDa. Therefore, transpleural transport from the sera occurs via diffusion⁹.

Depending on the objectives of biomarker dosage, several methods for selecting an optimal cutoff value have been proposed by expert authors^{19,29,30}. The repercussions of receiving a false-positive result for a diagnostic test are serious. Therefore, it was crucial to

ANEXO 6 – ARTIGO ORIGINAL 3 (PROVA PRÉ IMPRESSÃO)

2024-034 – Estágio: prova para autores

choose an optimal cutoff value of P-ADA ≤ 8.21 U/L for pleural transudates with high specificity using the Youden index (Table 2).

The AUC only shows the potential of a biomarker. For clinical and practical purposes, we need to dichotomize the test results to classify the subjects as diseased or nondiseased. However, the choice of an 'optimal' cutoff point for dichotomizing a continuous biomarker is not arbitrary. Youden's index is a better criterion because it selects biomarkers with larger values of both sensitivity and specificity³¹. The discrimination with an AUC of 0.820 was very good, according to the Hosmer–Lemeshow scale²². An AUC > 0.75 was clinically useful²⁶.

The kappa coefficient is another new method of assessing the performance of a diagnostic biomarker. It is used to evaluate the agreement between observers (two or more) for the quantification of categorical data. Cohen's kappa coefficient was 78% in our study. According to the Landis and Koch guidelines, the P-ADA had moderate ($k=0.41-0.60$) agreement ($k=0.4245$) for pleural transudate with the cutoff selected (≤ 8.21 U/L) in the ROC curve by the Youden index. A highest kappa coefficient (0.81-1.0) means stronger agreement with the response at a specific cutoff reference point^{21,32}.

There was some overlap between these evaluations of different aspects of biomarker performance. Therefore, it is important to evaluate a biomarker using multiple metrics and to consider the context in which it will be used^{10,11}.

To differentiate pleural exudate from transudate, Jadhav et al.⁵ accepted an ideal cutoff value of 22.0 U/L of P-ADA. The ROC curve method and cutoff criterion were not mentioned by the authors. A study published by Mehta et al.⁶ investigated the utility of P-ADA in pleural exudates. The optimal cutoff value published to distinguish pleural exudates from transudates was >35.0 U/L with an ROC curve. However, the criterion for selection was not explicitly stated. In another study on exudates, the optimal cutoff point for P-ADA was >15.3 U/L with the Youden's index criterion⁷.

ANEXO 6 – ARTIGO ORIGINAL 3 (PROVA PRÉ IMPRESSÃO)

2024-034 – Estágio: prova para autores

The P-ADA activity is also an accurate biomarker for tuberculous pleural effusion with high diagnostic performance in countries with an elevated incidence and prevalence of tuberculosis. In Brazil, our research group did not execute a closed needle pleural biopsy for the diagnosis. In inconclusive cases after two thoracenteses, the patient is directly referred to a VATS procedure³³.

Despite its observational methodology and analysis, this study had limitations. Before adopting accurate models in clinical practice, more studies using data from many hospitals are required for external validation. In addition, a single diagnostic biomarker may be inadequate. A panel of biomarkers is ideal to improve performance, such as diagnostic parameters and AUC. However, adequate statistical approaches with nonparametric analysis were the main reason for the correct interpretation of the results and conclusions. A better test for a scientific study depends on the research objectives. The choice depends on several factors, such as sample size, dataset distribution, statistical power, assumptions, and central tendency. The main advantage of nonparametric tests is that they are more robust and flexible than parametric tests, meaning that they can handle data that is skewed, has outliers, or has different scales or units. They also do not require large sample sizes or random sampling to be valid. Nonparametric tests are more common in medical statistics because they are a robust alternative to traditional methods when the test assumptions about the data distribution are not met. A common error in medical journals is to apply parametric statistical techniques to nonparametric data because medical researchers have been trained mainly on parametric tests, and many statistics packages actively support parametric statistical techniques³⁴⁻³⁶.

Future perspectives are positive because our diagnostic model is crucial for clinical practice and can be utilized to identify transudative pleural effusions with acceptable discrimination and predictive power (Figure 1, Table 2).

ANEXO 6 – ARTIGO ORIGINAL 3 (PROVA PRÉ IMPRESSÃO)

2024-034 – Estágio: prova para autores

Conclusion

This study concluded that the P-ADA biomarker with a cutoff selected of ≤ 8.21 U/L using receiver operating characteristic curve analysis with the Youden index criterion had a high diagnostic performance for pleural transudates.

REFERENCES

1. Hooper C, Lee YCG, Maskell N; BTS Pleural Guideline Group. Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society Pleural Disease Guideline 2010. *Thorax*. 2010;65(Suppl 2):ii4-17.
<https://doi.org/10.1136/thx.2010.136978>
2. Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball Jr WC. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med*. 1972;77:507-13.
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-77-4-507>
3. Maranhão BHF, Silva Junior CT, Chibante AMS, Cardoso GP. Determination of total proteins and lactate dehydrogenase for the diagnosis of pleural transudates and exudates: redefining the classical criterion with a new statistical approach. *J Bras Pneumol*. 2010;36(4):468-74.
<https://doi.org/10.1590/s1806-37132010000400012>
4. Zhulai G, Oleinik E, Shibaev M, Ignatev K. Adenosine-metabolizing enzymes, adenosine kinase and adenosine deaminase, in cancer. *Biomolecules*. 2022;12(13):418.
<https://doi.org/10.3390/biom12030418>
5. Jadhav AA, Bardapurkar JS. Diagnostic value of adenosine deaminase to differentiate exudates and transudates. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2007;51(2):170-4.
6. Mehta M, Marwah S, Shah H, Trivedi A. A study of the utility of lactate dehydrogenase, total proteins, and adenosine deaminase in the diagnosis of pleural exudates: A new statistical approach. *Int J Med Sci Public Health*. 2015;4(2):286-91.
<https://doi.org/10.5455/ijmsph.2015.2110201453>
7. Atalay F, Ernam D, Hasanoglu HC, Karalezli A, Kaplan O. Pleural adenosine deaminase in the separation of transudative and exudative pleural effusions. *Clin Biochem*. 2005;38:1066-70.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.07.009>
8. Zocchi L. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J*. 2002;20(6):1545-58.
<https://doi.org/10.1183/09031936.97.10010219>

ANEXO 6 – ARTIGO ORIGINAL 3 (PROVA PRÉ IMPRESSÃO)

2024-034 – Estágio: prova para autores

9. Apostolidou E, Tsilioni I, Hatzoglou C, Paschalis-Adam M, Konstantinos GI. Pleural transport physiology: insights from biological marker measurements in transudates. *Open Respir Med J*. 2011;5:70-2.

<https://doi.org/10.2174/1874306401105010070>

10. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Constantine AG, Glasziou PP, Irwig L, et al. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ*. 2015;351:h5527.

<https://doi.org/10.1136/bmj.h5527>

11. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP, STROBE Initiative. The Strengthening of Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *J Clin Epidemiol*. 2008;61(4):344-9.

<https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2007.11.008>

12. Michael CW, Davidson B. Pre-analytical issues in effusion cytology. *Pleura Peritoneum*. 2016;1(1):45-56.

<https://doi.org/10.1515/pp-2016-0001>

13. Ronca G. Competitive inhibition of adenosine deaminase by urea, guanidine, biuret, and guanidylurea. *Biochim Biophys Acta*. 1967;132(1):214-16.

[https://doi.org/10.1016/0005-2744\(67\)90216-1](https://doi.org/10.1016/0005-2744(67)90216-1)

14. Ajloo D, Saboury AA, Haghi-Asli N, Ataei-Jafari G, Moosavi-Movahedi AA, Ahmadi M, et al. Kinetic, thermodynamic, and statistical studies on the inhibition of adenosine deaminase by aspirin and diclofenac. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2007;22(4):395-406.

<https://doi.org/10.1080/14756360701229085>

15. Ataie G, Bagheri S, Divsalar A, Saboury AA, Safarian S. A kinetic comparison on the inhibition of adenosine deaminase by purine drugs. *Iran J Pharm Res*. 2007;6(1):43-50.

<https://doi.org/10.22037/ijpr.2010.697>

16. Delacour H, Sauvanet C, Ceppa F, Burnat P. Analytical performances of the Diazyme ADA assay on the Cobas® 6000 system. *Clin Biochem*. 2010;43(18):1468-71.

<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.09.005>

17. Negida A, Fahim NK, Negida Y. Sample size calculation guide - Part 4: How to calculate the sample size for a diagnostic test accuracy study based on sensitivity, specificity, and the area under the ROC curve. *Adv J Emerg Med*. 2019;3(3):e33.

<https://doi.org/10.22114/ajem.v0i0.158>

18. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*. 1988;44(3):837-45.

19. Hajian-Tilaki K. The choice of methods in determining the optimal cut-off value for quantitative diagnostic test evaluation. *Stat Methods Med Res*. 2018;27(8):2374-83.

<https://doi.org/10.1177/0962280216680383>

ANEXO 6 – ARTIGO ORIGINAL 3 (PROVA PRÉ IMPRESSÃO)

2024-034 – Estágio: prova para autores

20. Dwivedi AK. How to write a statistical analysis section in medical research. *J Investig Med*. 2022;70(8):1759-70.
<https://doi.org/10.1136/jim-2022-002479>
21. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
22. Hosmer Jr, DW, Lemeshow S. *Applied logistic regression*. 2nd Edition. New York: John Wiley & Sons, 2004; pp. 50-5.
23. Metz CE. Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med*. 1978;8(4):283-98.
[https://doi.org/10.1016/s0001-2998\(78\)80014-2](https://doi.org/10.1016/s0001-2998(78)80014-2)
24. Nahm FS. Receiver operating characteristic curve: overview and practical use for clinicians. *Korean J Anesthesiol*. 2022;75(1):25-36.
<https://doi.org/10.4097/kja.21209>
25. Åsberg A, Mikkelsen G, Odsæter IH. A new index of clinical utility for diagnostic tests. *Scand J Clin Lab Invest*. 2019;79(8):560-5.
<https://doi.org/10.1080/00365513.2019.1677938>
26. Fan J, Upadhye S, Worster A. Understanding receiver operating characteristic (ROC) curves. *CJEM*. 2006;8(1):19-20.
<https://doi.org/10.1017/s1481803500013336>
27. Evans PT, Zhang RS, Cao Y, Breslin S, Panebianco N, Baston CM, Dibardino DM. The use of thoracic ultrasound to predict transudative and exudative pleural effusion. *POCUS J*. 2021;6(2):97-102.
<https://doi.org/10.24908/pocus.v6i2.15193>
28. Tsiriktsis N. A review of techniques for treating missing data in OM survey research. *J Oper Manag*. 2005;24(1):53-62.
<https://doi.org/10.1016/j.jom.2005.03.001>
29. Habibzadeh F, Habibzadeh P, Yadollahie M. On determining the most appropriate test cut-off value: the case of tests with continuous results. *Biochem Med (Zagreb)*. 2016;26(3):297-307.
<https://doi.org/10.11613/bm.2016.034>
30. Caraguel CGB, Stryhn H, Gagné N, Dohoo IR, Hammell KL. Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches. *J Vet Diagn Invest*. 2011;23(1):2-15.
<https://doi.org/10.1177/104063871102300102>
31. Le CT. A solution for the most basic optimization problem associated with an ROC curve. *Stat Methods Med Res*. 2006;15(6):571-84.
<https://doi.org/10.1177/0962280206070637>
32. Chang C-H. Cohen's kappa for capturing discrimination. *Int Health*. 2014;6(2):125-9.

ANEXO 6 – ARTIGO ORIGINAL 3 (PROVA PRÉ IMPRESSÃO)

2024-034 – Estágio: prova para autores

<https://doi.org/10.1093/inthealth/ihu010>

33. Behrsin RF, Silva Junior CT, Cardoso GP, Barillo JL, Souza JBS, Araujo EG. Combined evaluation of adenosine deaminase level and histopathological findings from pleural biopsy with Cope's needle for the diagnosis of tuberculous pleurisy. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(6):7239-46.

34. Turner R, Samaranayaka A, Cameron C. Parametric vs nonparametric statistical methods: which is better, and why? *N Z Med Stud J.* 2020;30:61-2.

35. Nahm FS. Nonparametric statistical tests for the continuous data: the basic concept and the practical use. *Korean J Anesthesiol.* 2016;69(1):8-14.
<https://doi.org/10.4097/kjae.2016.69.1.8>

36. Schober P, Vetter TR. Nonparametric statistical methods in medical research. *Anesth Analg.* 2020;131(6):1862-3.
<https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000005101>

2024-034 – Estágio: prova para autores

Table 1: Demographic characteristics with laboratory analysis in transudates and exudates in 157 pleural fluids.

Parameter	Transudate	Exudate	Statistical test (2-sided p-value)
Sample size, n	33	124	-
Prevalence (%)	21.0	79.0	$\chi^2=39.288$ ($p<0.0001$)
Age, years, median IQR (25 th – 75 th %)	76.0 (63.0 – 86.0)	58.0 (41.0 – 73.0)	U=895 ($p<0.0001$)
Male, n (%)	16 (48.0)	58 (47.0)	$\chi^2=0.005$ ($p=0.9438$)
Female, n (%)	17 (52.0)	66 (53.0)	$\chi^2=0.005$ ($p=0.9416$)
Total pleural ADA, median IQR (25 th – 75 th %)	6.85 (2.67 – 11.26)	18.4 (9.25 – 41.4)	U=679.5 ($p<0.0001$)
Total pleural protein, mean ± standard deviation*	2.64 ± 1.52	5.05 ± 1.10	t=2.498 ($P=0.0186$)
Total pleural LDH, median, IQR (75 th – 25 th %)	190.5 (100.5 – 278.8)	568.5 (400.3 – 822.5)	U=306.0 ($p<0.0001$)

Abbreviations: ADA, adenosine deaminase; LDH, lactate dehydrogenase; IQR, interquartile range. Statnote: The Shapiro–Wilk test (W) rejected the normal data from pleural total ADA, age, and pleural total LDH in exudates ($p<0.05$), but not pleural total protein in transudates ($p=0.0881$). (*) After the logarithmic transformation of data.

ANEXO 6 – ARTIGO ORIGINAL 3 (PROVA PRÉ IMPRESSÃO)

2024-034 – Estágio: prova para autores

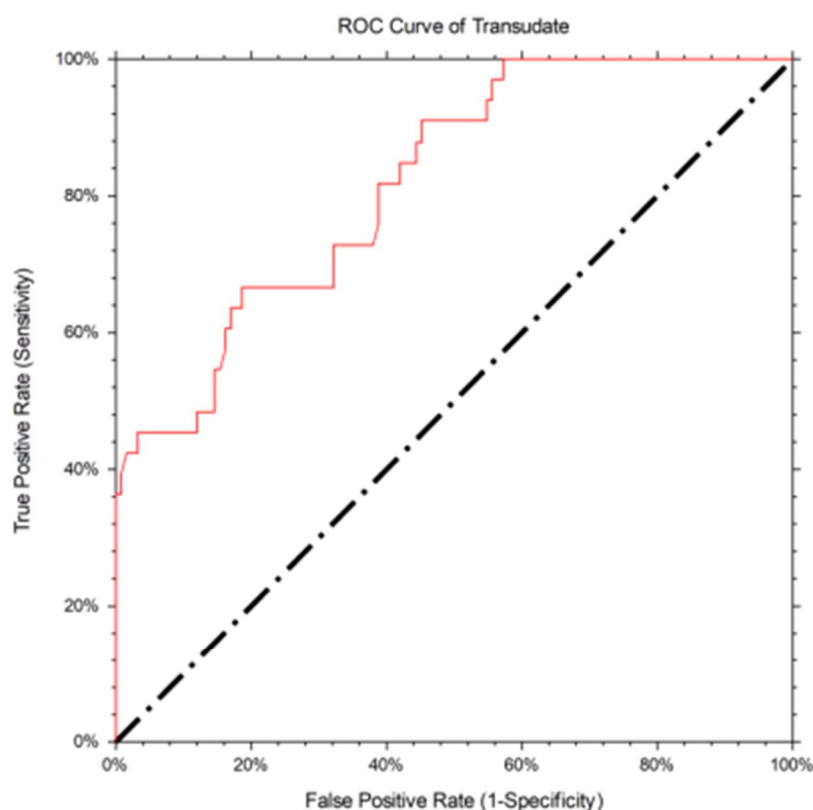


Figure 1: Nonparametric ROC curve of pleural adenosine deaminase for transudate diagnosis. The selection criterion was the Youden index ($J=0.4812$; distance to the ROC curve corner= 0.3815). The optimal cutoff value for ROC curve concavity was ≤ 8.21 U/L of P-ADA. Evaluation metric for checking the model's performance: AUC, 0.8203; 95% CI, 0.7270-0.8838; SE, 0.0393; Z-value to test, 8.157; p value, 0.0000. Abbreviations: CI, confidence interval; AUC, area under the ROC curve; SE, standard error.

ANEXO 6 – ARTIGO ORIGINAL 3 (PROVA PRÉ IMPRESSÃO)

2024-034 – Estágio: prova para autores

Table 2: Measures of diagnostic parameters of adenosine deaminase following selection of the best cutoff point for pleural transudates according to the Youden index in the ROC curve.

Diagnostic parameter	Result (%)**	95% Confidence interval
Best cutoff (U/L)	≤8.21	-
Sensitivity	66.67	48.17-82.04
Specificity	81.45	73.48-87.66
Positive predictive value*	48.89	33.70-64.23
Negative predictive value*	90.18	83.11-94.99
Positive likelihood ratio	4.97	2.21-11.2
Negative likelihood ratio	0.56	0.39-0.82
Diagnostic odds ratio	8.78	0.78-18.34
Predictive accuracy*	78.34	80.28-91.53
Disease prevalence*	21.0	-

(*) These values are dependent on disease prevalence. (**) The chi-square statistic=29.5138 (p=0.00001). Statnote: The Youden index at the ROC curve is the optimal cutoff value that provides the best tradeoff between sensitivity and specificity.