

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**“ACTIVACIÓN PLAQUETARIA EN FIBROSIS QUISTICA EN RELACIÓN  
A LA COLONIZACIÓN POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA”**

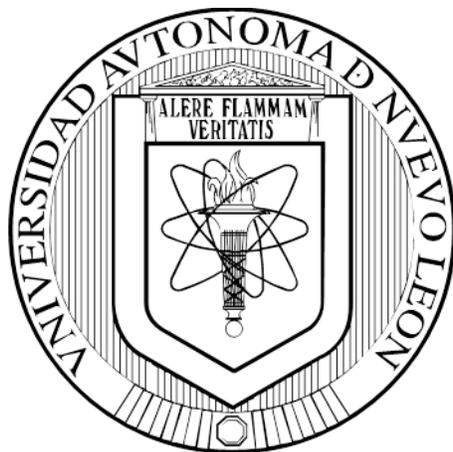
**POR**

**DRA. ADRIANA ESTER BUSTAMANTE**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN MEDICINA**

**FEBRERO, 2017**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**“ACTIVACIÓN PLAQUETARIA EN FIBROSIS QUISTICA EN RELACIÓN  
A LA COLONIZACIÓN POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA”**

**POR**

**DRA. ADRIANA ESTER BUSTAMANTE**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN MEDICINA**

**FEBRERO, 2017**

**“ACTIVACION PLAQUETARIA EN FIBROSIS QUISTICA EN  
RELACIÓN A LA COLONIZACION POR *Pseudomonas aeruginosa*”**

**Aprobación de la tesis:**

---

**Dr. med. José Carlos Jaime Pérez  
Director de la tesis**

---

**Dr. en C. Paula Cordero Pérez  
Co director**

---

**Dr. PhD Linda Elsa Muñoz Espinosa  
Miembro**

---

**Dr. med. Gabriela Galindo Rodríguez  
Miembro**

---

**Dr. med. Juan O Galindo Galindo  
Miembro**

---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez  
Subdirector de Estudios de Posgrado**

## **DEDICATORIA**

**A mi familia:**

**A mi esposo y a mis hijos por apoyarme siempre en todo lo que emprendo y comprender mi necesidad de superación.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Para lograr este proyecto fue necesaria la ayuda de muchas personas a las cuales agradezco enormemente:

Gracias **Dr. José Carlos Jaime Pérez**, por su valiosa asesoría y porque a pesar de tener mucha gente a su cargo siempre estuvo pendiente de mi proyecto y de resolver todas mis dudas, gracias por ser la persona que me empuja a lograr más en mi carrera.

Gracias a la **Dra. Paula Cordero Pérez** por su valioso trabajo en el laboratorio para demostrar el problema planteado en esta tesis, y por alentarme a seguir preparándome.

Gracias a la **Dra. Gabriela Galindo**, a la **Dra. Linda Muñoz Espinosa** y al **Dr. Juan O Galindo Galindo** por su apoyo en la revisión y comentarios realizados durante la ejecución de este proyecto.

Gracias al **Dr. Roberto Mercado Longoria** y a **CEPREP** por el apoyo recibido en estos años que llevo trabajando en la clínica de fibrosis quística.

Gracias al **Dr. Cesar Daniel Villarreal Villarreal** por el apoyo recibido en el trabajo estadístico y por estar al pendiente de los resultados.

Gracias a la **Dra. Gloria González González** y a todo el personal del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, quienes desde hace 16 años me apoyan con los estudios microbiológicos de estos pacientes.

Gracias a los pacientes y sus familias por participar en este proyecto.

**GRACIAS**

# TABLA DE CONTENIDO

|   | Página |
|---|--------|
| . RESÚMEN. ....   | 10     |
| Capítulo I  |        |
| I. INTRODUCCIÓN. ....   | 11     |
| 1.1 La base genética de la enfermedad                         |        |
| 1.2 Fisiopatología, infección bacteriana e inflamación en FQ  |        |
| 1.3 Papel de las plaquetas en el paciente FQ.                 |        |
| Capítulo II   |        |
| 2. HIPÓTESIS. ....  | 24     |
| Capítulo III  |        |
| 3. OBJETIVOS. ....  | 25     |
| Capítulo IV   |        |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS. ....                                   | 26     |
| 4.1 Área física   |        |
| 4.2 Pacientes incluidos en el estudio                         |        |
| 4.3 Criterios de inclusión de pacientes                       |        |
| 4.4 Criterios de exclusión                                    |        |
| 4.5 Revisión de expedientes clínicos                          |        |
| 4.6 Seguimiento de la evolución de los pacientes              |        |
| 4.7 Obtención de sangre periférica para los análisis de suero |        |
| 4.8 Análisis de los parámetros en suero                       |        |
| 4.9 Análisis estadístico                                      |        |
| Capítulo V  |        |
| 5.1. RESULTADOS. ....   | 31     |
| Capítulo VI   |        |
| 6. DISCUSIÓN. ....  | 38     |
| Capítulo VII  |        |
| 7. CONCLUSIÓN. ....   | 43     |

Capítulo VIII

8. Anexos..... 44

Capitulo IX

9. Bibliografía..... 53

Capitulo X

11. Resumen Autobiográfico..... 56

## INDICE DE TABLAS

| <b>Tabla</b>  | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| 1. Características generales de los pacientes.....  | 33            |
| 2. Relación marcadores con infección por <i>P. aeruginosa</i> .....                                     | 34            |
| 3. Comparación de infección con <i>P. aeruginosa</i> vs función pulmonar<br>y estudios de imágenes..... | 35            |

## INDICE DE FIGURAS

| <b>Figura</b>   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| 1. Marginación y Rolado plaquetario .....                               | 18            |
| 2. Distribución de genotipos de CFTR.....                               | 32            |
| 3. Medianas de CD40Ls en los tres grupos de pacientes FQ.....           | 36            |
| 4. Curva ROC de la asociación entre CD40Ls y <i>P. aeruginosa</i> ..... | 37            |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| <b>FQ</b>                         | Fibrosis quística   |
| <b>P. aeruginosa</b>              | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                   |
| <b>CFTR</b>                       | Regulador de conductancia de transmembrana de fibrosis quística |
| <b>CD40Ls</b>                     | Fracción Soluble del CD 40 Ligando                              |
| <b>IL6</b>                        | Interleucina 6  |
| <b>TNF<math>\alpha</math></b>     | Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$                             |
| <b>ICAM 1</b>                     | Moléculas de adhesión intercelular                              |
| <b>TXA2</b>                       | Tromboxano A2   |
| <b>pg</b>                         | Picogramos  |
| <b>CVF</b>                        | Capacidad Vital Forzada   |
| <b>VEF1</b>                       | Volumen espiratorio forzado en el primer segundo                |
| <b>Ac anti-<i>Pseudomonas</i></b> | Anticuerpos anti <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .                |
| <b>IMC</b>                        | Índice de masa corporal.  |
| <b>VEGF</b>                       | Factor de crecimiento endotelial vascular                       |
| <b>TAC</b>                        | Tomografía axial computada                                      |
| <b>ROC</b>                        | Receiver Operating Characteristic                               |
| <b>LBA</b>                        | Lavado bronco-alveolar  |
| <b>PMN</b>                        | Polimorfonucleares  |
| <b>PAF</b>                        | Factor activador plaquetario                                    |
| <b>AA</b>                         | Acido araquidónico  |

## RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina  
Hospital Universitario « Dr Jose Eleuterio González »  
Servicio de Neumología

Presenta: **Adriana Ester Bustamante**

**Título del estudio:**

### **ACTIVACION PLAQUETARIA EN FIBROSIS QUISTICA EN RELACION A LA COLONIZACION POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

**Introducción:** La Fibrosis quística (FQ) es una enfermedad caracterizada por inflamación pulmonar progresiva desencadenada por infección. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) es el principal patógeno que infecta al paciente con FQ y es el determinante del deterioro de la función pulmonar y de la sobrevida acortada. El contar con un marcador en sangre periférica de la presencia del patógeno será de mucha ayuda. **Objetivos:** Evaluar la activación plaquetaria medida por el CD40Ls, y relacionarlos con la presencia de *P. aeruginosa* en la vía aérea. **Métodos:** Se evaluaron 60 pacientes estables con FQ seguidos en la Clínica de FQ del H. Universitario. Los datos registrados incluyen información demográfica, genotipo CFTR, espirometrías, radiografías y tomografías, recuentos de plaquetas en sangre periférica, CD40Ls, IL6, TNF  $\alpha$ , VEGF, ICAM1, cultivos de expectoración y/o exudado faríngeo, serología Anti *P. aeruginosa*. Los pacientes fueron divididos en tres grupos: 1. nunca infectados por *P. aeruginosa*, 2. con infección intermitente y 3. con colonización crónica. **Resultados:** Los pacientes con FQ y colonización crónica con *P. aeruginosa* tuvieron un incremento significativo de los niveles de Ac Anti *P. aeruginosa* ( $11.60 \pm 2.15$  unidades) así como de CD40Ls en plasma ( $1530.9 \pm 1162.3$  pg vs  $1008.1 \pm 746.8$  pg,  $p < 0.010$ ) comparando con pacientes nunca colonizados. El daño pulmonar en los tres grupos estudiados representados a través del Score radiológico, del Score tomográfico y de las pruebas funcionales respiratorias tuvieron también significancia estadística ( $p < 0.001$ ). **Conclusión:** Nuestros hallazgos sugieren que la activación plaquetaria medida a través del CD40Ls podría representar un biomarcador predictor de la presencia de *P. aeruginosa* en el paciente con FQ.

Dr. José Carlos Jaime Pérez  
Director de Tesis

## Capítulo I

### 1. INTRODUCCIÓN

La Fibrosis quística (FQ) es la enfermedad hereditaria más común que acorta la vida y afecta alrededor de 70,000 personas alrededor del mundo. La FQ es una enfermedad autosómica recesiva, que se produce debido a mutaciones en el gen que codifica para el Regulador de conductancia de transmembrana de fibrosis quística (CFTR) localizado en el brazo largo del cromosoma 7 (1).

#### 1.1 La base genética de la enfermedad

El gen que codifica para el CFTR se identificó y clonó recién en 1989, es un gen relativamente grande, consta de 27 exones y los intrones tienen información que permite el splicing alternativo del ARN. Esta particularidad puede disminuir la cantidad de proteína expresada.

Una vez conocido el gen se pudo identificar la secuencia de la proteína. La proteína CFTR es una glicoproteína transportadora de membrana que funciona como canal iónico regulado por AMP cíclico principalmente para el cloro pero también regula canales epiteliales de sodio, canales renales medulares de potasio, canales alternativos de cloro, etc.(1-3).

Está formada por dos dominios de transmembrana (TM1 y TM2), dos sitios de unión a nucleótidos (NBF1 y NBF2) y un dominio regulador con varios sitios de fosforilación dependientes de AMP cíclico, que controla la apertura o cierre del canal (4).

De acuerdo a las estadísticas de la base internacional de mutaciones reportadas para FQ, más de 2000 mutaciones de CFTR han sido identificadas. A nivel de la vía aérea estas mutaciones conducen a defectos en el CFTR causando secreción reducida de cloro, favoreciendo la reabsorción de sodio, resultando en secreciones deshidratadas, pobre aclaramiento mucociliar y obstrucción de la vía aérea (5-6).

La mutación más común es la F508 del y la encontramos en aproximadamente dos tercios de los alelos en pacientes con FQ y su prevalencia sigue un orden decreciente del noroeste al sureste de Europa (7).

El tercio restante de los alelos son muy heterogéneos con poco más de 20 mutaciones que ocurren en el mundo con una frecuencia arriba de 1 %.

Las mutaciones pueden ser clasificadas, de acuerdo a un criterio funcional, en seis tipos diferentes.

- Mutaciones de Clase I: en ellas está alterada la producción de la proteína y a menudo son mutaciones sin sentido con codones de terminación prematuros. Las mutaciones de clase I incluyen la G542X (común en Francia y Bretaña), R1162X (frecuente en Austria y norte de Italia) o la W1282X (común en judíos Askenazí).
- Mutaciones de Clase II: que además de la F508 del incluye R560T, R1066C, y N1303K entre otras, estas mutaciones afectan el procesamiento de la proteína CFTR debido a una falta de plegamiento de la proteína que es reconocido por el retículo endoplásmico y retenido por el mismo debido a la conformación anormal para ser degradada.

- Mutaciones de Clase III: también llamadas mutaciones de compuerta debido a que está alterada la regulación del canal y por lo tanto la compuerta no se abre, como ejemplo tenemos las mutaciones G551D y la S549 N.
- Mutaciones de Clase IV: en ellas la conductancia o flujo de los iones está alterada a través del canal ejemplo R334W.
- Mutaciones de Clase V: en las que están reducidos los niveles de la proteína a menudo debido que se afecta el splicing y se generan transcritos aberrantes y normales, cuyos niveles varían entre pacientes, así como en los diferentes órganos del cuerpo de cada paciente en particular, como ejemplo la mutación 3849+10kbC-T.
- Mutaciones de Clase VI: que son aquellas mutaciones que alteran la estabilidad de la proteína CFTR madura en la membrana apical ejemplo 120 del 23 (2, 6).

## **1.2 Fisiopatología, infección bacteriana e inflamación en FQ**

Las mutaciones del gen del CFTR producen una proteína anormal que causa las siguientes alteraciones en grados variables:

1. Un incremento en la viscosidad de las secreciones de las glándulas productoras de moco
2. Una concentración anormal de iones en las secreciones de las glándulas serosas por ejemplo del cloro y sodio en el sudor

3. Un aumento en la susceptibilidad a colonización endo-bronquial crónica por bacterias específicas como *P. aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

El proceso de colonización-infección broncopulmonar mejor conocido y estudiado en FQ es el de *P. aeruginosa*, ya que es el que se asocia a mayor deterioro de la función pulmonar.

En los pacientes adultos más del 80% de ellos están colonizados por este germen, y persiste durante años de forma crónica.

En algunos pacientes la colonización inicial por *P. aeruginosa* se produce tempranamente, la característica de esas bacterias iniciales, obtenidas en los cultivos de secreciones producen colonias no mucosas, son generalmente sensibles a todos los antimicrobianos y es posible eliminarlas de la vía aérea con tratamientos apropiados.

Luego los pacientes entran en una etapa conocida como de colonización intermitente, debido a que los cultivos son positivos en ocasiones, pero en otras no, pueden ser morfotipos o cepas no mucosas que coexisten con cepas mucoides, aunque conservan los flagelos, la movilidad y la sensibilidad a antimicrobianos.

A medida que la colonización persiste *P. aeruginosa* produce alginato, crece en biopelículas o biofilm, dificultando el tratamiento con antibióticos y los procesos de defensa del huésped, a partir de este momento los cultivos son siempre positivos para esta bacteria y se entra en la fase conocida como colonización crónica. *P. aeruginosa* sufre cambios adaptativos, pierde su flagelo, se vuelve

inmóvil y aumenta su resistencia a los antimicrobianos creciendo como una gran masa bacteriana en la superficie mucosa de la vía aérea (2).

La obstrucción de la vía aérea, la colonización/ infección por patógenos, en particular *P. aeruginosa*, una alteración, no bien comprendida de las defensas del huésped y una respuesta inflamatoria incrementada se unen para llevar a infección crónica y daño pulmonar progresivo.

Por lo tanto el curso de la infección en pacientes FQ parece ocurrir en tres diferentes estadios: No presencia de *P. aeruginosa* en vías aéreas, *P. aeruginosa* inicial o reciente no mucoide y *P. aeruginosa* crónica o mucoide (8).

Hay un gran debate acerca de cuál es el defecto básico que causa la inflamación pulmonar aún sin infección o si la inflamación es una respuesta exagerada a las infecciones bacterianas sostenidas.

Trabajos previos han demostrado cambios inflamatorios en hígado y páncreas que no están infectados, así como también incremento de los mediadores inflamatorios y neutrófilos en vías aéreas no infectadas (9). Sin embargo, no hay duda que la inflamación pulmonar es más intensa en presencia de infección crónica (8-10). Ya sea que la inflamación preceda o siga a la infección, se produce en una medida exuberante y como parte de este proceso se ha demostrado en pacientes FQ que las plaquetas contribuyen importantemente a este proceso.

### **1.3 Papel de las plaquetas en el paciente FQ**

Las plaquetas, fragmentos de citoplasma anucleados que tienen una vida útil de 8 a 12 días son bien conocidas por tener un papel clave en la hemostasia y la trombosis. En los últimos años se ha hecho evidente que desempeñan un papel importante en la inflamación (11).

Las plaquetas no sólo se producen en la médula ósea, sino también en la sangre periférica y en la circulación pulmonar. Se comportan como una clásica célula inflamatoria. Ellas pueden sufrir quimiotaxis, contener y liberar proteínas adhesivas, activar otras células inflamatorias, liberar sustancias vaso-activas, y tienen la capacidad de expresar o liberar mediadores pro-inflamatorios como el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), prostaglandinas, factor activador plaquetario (PAF) así como otras citocinas y quimosinas (12).

La liberación de mediadores de los gránulos plaquetarios y otros mediadores producidos por las mismas plaquetas favorecen la respuesta inflamatoria:

- Liberan histamina y serotonina que aumenta la permeabilidad vascular.
- Inducen liberación de histamina por los basófilos.
- Estimulan adherencia de eosinófilos a la pared vascular.
- Liberan RANTES que juega un rol en reclutar y adherir monocitos al endotelio activado.
- Las plaquetas potencian el proceso inflamatorio inhibiendo la apoptosis de polimorfonucleares (PMN), monocitos y eosinófilos.

- Metabolizan ácido Araquidónico (AA) por la vía de la ciclo-oxigenasa para producir mediadores como TXA2 y por la vía de la lipo-oxigenasa producen 12 Hidroxieicosatetraenoico.
- La lipo-oxigenasa plaquetaria interactúa con los productos del metabolismo de AA de otras células como PMN para producir lipoxinas.
- PMN estimulados por endotoxinas liberan PAF, el cual las activa, y éstas a su vez reclutan más PMN.

En conclusión, una vez que la cascada inflamatoria ha sido iniciada, leucocitos y plaquetas se combinan para propagar y amplificar la inflamación (12).

Las plaquetas no solo son activadas a través de las vías tradicionales (trombina, ADP, TXA2) sino que pueden ser estimuladas por complejos antígeno-anticuerpo, micro-organismos, endotoxinas bacterianas incluyendo el lipopolisacárido de *P. aeruginosa*.

Las plaquetas ayudan a la marginación de los leucocitos en los vasos, así como al fenómeno de rolado de los mismos en los endotelios, luego por medio de la expresión de moléculas de adhesión llevan a la adherencia firme y diapédesis de los leucocitos en las zonas inflamadas.

La acumulación de neutrófilos y el subsecuente daño tisular son el resultado de un proceso de varios pasos que comprenden marginación inicial de las células sanguíneas circulantes a la pared de los vasos sanguíneos, el fenómeno de rodar sobre el endotelio vascular, seguido de firme adherencia y finalmente extravasación. Esta secuencia de eventos es mediada por el involucro de diferentes familias de moléculas de adhesión, mientras que la marginación de

los neutrófilos es mediada por selectinas. La firme adherencia resulta de interacción de Beta2 integrinas neutrofilicas con moléculas de adhesión expresadas en los endotelios. Fig.1

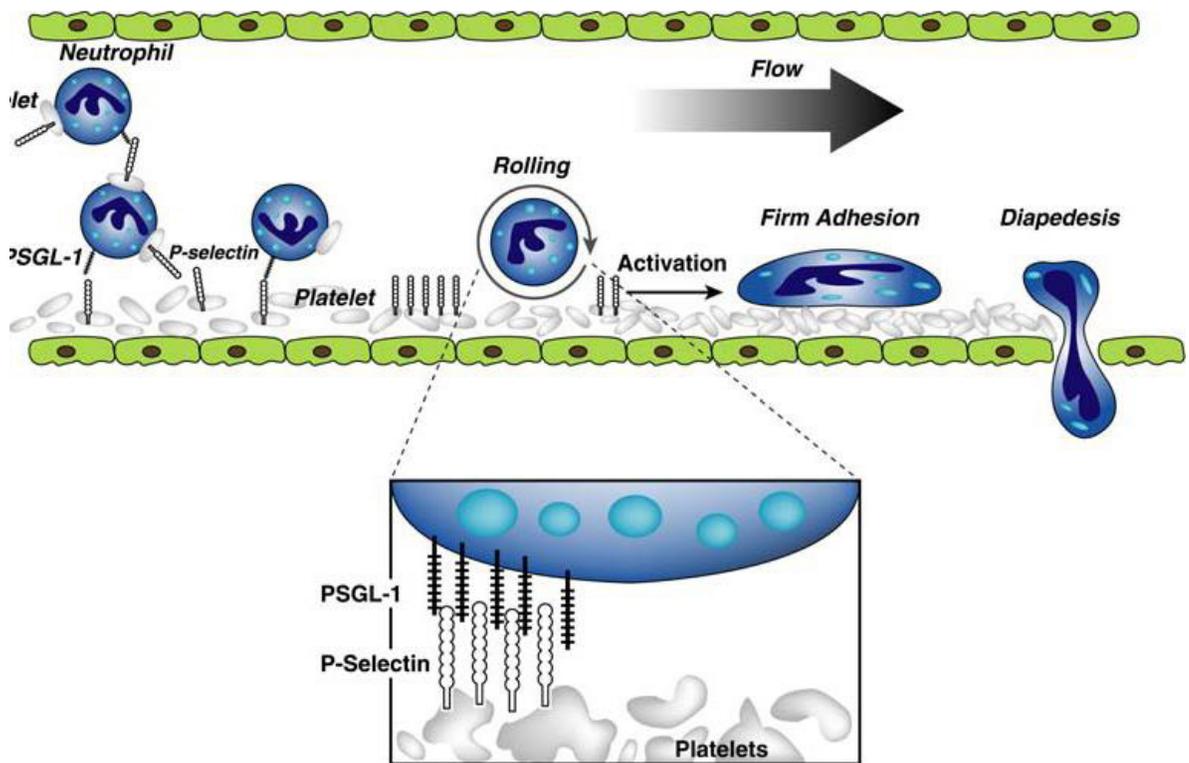


Figura 1. Las plaquetas ayudan a que los leucocitos rueden por el endotelio. grafico tomado de Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2006-vol 173:483-490).

La formación de agregados de plaquetas leucocitos en la circulación aumenta el reclutamiento de PMN y otros leucocitos en la superficie endotelial. Allí, las plaquetas y la P-selectina se unen a la glicoproteína ligando de P-selectina 1(PSGL-1), que se expresa constitutivamente en la superficie de leucocitos. Esto conduce a la marginación y rolado de los leucocitos, el primer paso en su

reclutamiento. El complejo P-selectina/ PSGL-1 aumenta la expresión de moléculas de adhesión lo que lleva a la adhesión firme y diapédesis.

En la circulación sistémica esta secuencia de eventos se localiza en el compartimiento venular. En contraste, en el pulmón el sitio prevalente de acumulación y emigración de neutrófilos es el lecho capilar pulmonar. En los capilares pulmonares los neutrófilos no ruedan, sino que son temporalmente retenidos en distintos sitios del lecho capilar alveolar por períodos que van de menos de un segundo hasta 20 minutos. Este fenómeno ha sido atribuido a retención mecánica de neutrófilos circulantes en segmentos estrechos de la red capilar alveolar. Esta retención mecánica deforma los neutrófilos, dándoles forma elongada y finalmente permite que continúen pasando. Parecería que la P-selectina no tendrían la misma función que en la circulación sistémica, sino que serían amplificadores de la activación de plaquetas y neutrófilos, tanto en asma, FQ, Síndrome de dificultad respiratorio agudo y otras enfermedades inflamatorias pulmonares (12).

Las plaquetas segregan moléculas co-estimuladoras como el ligando CD40 o CD40L. El CD40 L es una citosina miembro de la familia del FNT. Este mediador interviene en la maduración de las células dendríticas (13).

La forma soluble del CD40L (CD40Ls) en la circulación humana es casi enteramente derivada de plaquetas. Niveles elevados de CD40Ls están asociados a condiciones tales como enfermedad vascular, trombosis o coagulación anormal, lesión pulmonar y enfermedad autoinmune (13).

El aumento de los niveles del CD40Ls en la sangre transfundida está asociado con lesión pulmonar aguda relacionada a transfusión, una complicación

potencialmente fatal, y se postula que es la vía final común para esta complicación, así como también de reacciones de menor importancia asociadas a transfusión como fiebre y temblores (13).

El receptor para el CD40L es encontrado en los fibroblastos, en neutrófilos, células endoteliales, así como en las mismas plaquetas. Este eje CD40-CD40L está involucrado en muchas vías de señales intercelulares. El CD40L soluble está involucrado en la activación de los neutrófilos mediada por plaquetas y existe una relación recíproca.

Los pacientes con FQ tienen incremento de los agregados heterotípicos de leucocitos-plaquetas e incremento de la reactividad de las plaquetas a los agentes agonistas cuando se los compara con controles sanos (14).

También se ha demostrado un incremento de las plaquetas activadas circulantes. Este incremento de las plaquetas activadas en FQ es el resultado de factores intrínsecos de las plaquetas mediados por AMP cíclico y por factores plasmáticos según demostró O'Sullivan y col en su artículo a través de los agregados heterotípicos de monocitos-plaquetas, agregados neutrófilos-plaquetas y P-selectina (CD62P) en la superficie plaquetaria (14).

Sturm y colaboradores demostraron un incremento de la actividad pro inflamatoria de las plaquetas en pacientes clínicamente estables con FQ a través del ligando CD40 L y CD62P. También se demostró que los pacientes FQ tenían incremento significativo de los niveles circulantes de CD40Ls comparados con los controles sanos, además hubo una correlación inversa de los niveles de CD40Ls con el Volumen Espiratorio Forzado en el primer

segundo. También se demostró que los agregados de plaquetas-leucocitos se elevaron más en pacientes con FQ de más larga evolución (15-16).

Se ha sugerido que en pacientes con FQ el CD40Ls podría ser responsable de unir el estado inflamatorio, el daño endotelial y la activación plaquetaria conduciendo a un daño progresivo del parénquima pulmonar (15).

La relación entre las plaquetas y la infección por *P. aeruginosa* ha sido poco estudiada. Existe un reporte de Köning B y col, quienes demostraron inducción de la liberación del mediador inflamatorio Acido 12 hydroxyeicosatetraenoico de las plaquetas humanas por *P. aeruginosa* (17-18).

### **Justificación**

El principal patógeno respiratorio en FQ es *P. aeruginosa* y parece ser el principal responsable de la sobrevida disminuida a largo plazo, ya que numerosos trabajos vinculan la colonización crónica por *P. aeruginosa* de la vía respiratoria con la progresión de la enfermedad pulmonar (8, 10, 19-25) la cual es la principal causa de muerte en estos pacientes.

Los recién nacidos con FQ tienen pulmones estructuralmente normales y no se ha detectado *P. aeruginosa* en ellos (25), pero este patógeno en su variante no mucóide es adquirido después de un periodo de tiempo variable(26). Esta variante no mucóide puede ser erradicada con tratamiento antibiótico agresivo (27-28).

*P. aeruginosa* mucoide, un fenotipo mutante se desarrolla en una etapa subsecuente y produce un alginato exo-polisacárido que le confiere aspecto mucoide a las colonias, resistencia a la fagocitosis y a los antibióticos (29). *P. aeruginosa* mucoide aparentemente no puede ser erradicada por los tratamientos habitualmente utilizados y se vuelve predominante con la edad. La detección precoz de este patógeno es fundamental en el seguimiento del paciente con FQ a fin de indicar el tratamiento apropiado para conseguir su erradicación y frenar la progresión de la enfermedad.

La combinación de técnicas bacteriológicas con técnicas moleculares y serología incrementa la detección de la infección -colonización por *P. aeruginosa* en FQ.(30-33) pero estas técnicas no siempre son efectivas o aplicables, por lo que buscar un indicador del estado de infección es de gran importancia.

El momento exacto en que comienza el proceso inflamatorio en la vía respiratoria del paciente con FQ no es conocido así como tampoco ha sido demostrado si habría alguna relación entre la entrada de *P. aeruginosa* y la activación plaquetaria.

Se ha demostrado que existe una relación entre las plaquetas y enfermedad pulmonar, por lo que la activación de las plaquetas con liberación de mediadores inflamatorios podría jugar un rol muy importante en la patogénesis de la enfermedad pulmonar ligada a FQ, Nosotros creemos que si estudiamos el CD40Ls en sangre periférica en pacientes con FQ y lo relacionamos con el estado de la colonización-infección por *P. aeruginosa*, podremos conocer el rol de la activación plaquetaria en la enfermedad pulmonar fibro-quística así como evaluar la posibilidad de que esta citocina constituya un marcador subrogado

de la infección por *P. aeruginosa*. Es por ello que nos propusimos estudiar los niveles de CD40Ls, así como otras citocinas circulantes en los pacientes con FQ de la clínica del CEPREP, en un estudio prospectivo para evaluar la asociación del perfil de citocinas con la infección por *P. aeruginosa*.

Si demostramos asociación entre los niveles sanguíneos de CD40Ls y la infección por *P. aeruginosa*, los niveles circulantes de esta citocina sola o en combinación con otros mediadores, podrán ser utilizados como biomarcador y ayudarán a sospechar la presencia de este patógeno en la vía aérea del paciente FQ e intensificar su búsqueda.

Una mejor comprensión de este fenómeno podría conducir a intervenciones clínicas novedosas, pues se ha visto que agentes inflamatorios que inhiben la producción y liberación de mediadores inflamatorios derivados de plaquetas hacen más lenta la progresión de la enfermedad pulmonar en FQ.

## Capítulo II

### HIPÓTESIS

La infección de la vía aérea por *P. aeruginosa* conduce a activación de las plaquetas, lo que se evidencia por los niveles elevados de CD40Ls.

## Capítulo III

### OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general:

Demostrar la activación de plaquetas a través de los niveles de CD40Ls y su asociación con la infección - colonización por *Pseudomonas aeruginosa* en la vía aérea de pacientes con FQ.

#### 3.2 Objetivos particulares

- 3.2.1 Evaluar la infección de la vía aérea a través de cultivos de secreciones respiratorias y/o exudado faríngeo.
- 3.2.2 Evaluar la respuesta serológica a la infección por *P. aeruginosa* a través de anticuerpos específicos (Pseudomonas CF Ig. G Elisa)
- 3.2.3 Realizar análisis bioquímico cuantitativo de citosinas inflamatorias en muestras de suero de pacientes con FQ en particular CD40 Ls.
- 3.2.4 Evaluar las características clínicas, funcionales (CVF, VEF1, VEF1/CVF) y de imágenes de los pacientes y correlacionarlos con la inflamación e infección de la vía aérea durante el seguimiento clínico.

## **Capítulo IV**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **4.1 Área física**

El proyecto se desarrolló en la Clínica de Fibrosis Quística perteneciente al Servicio de Neumología, en la Unidad de Hígado y en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL.

#### **4.2 Pacientes incluidos en el estudio**

En este estudio se incluyeron pacientes que acudieron a la clínica de Fibrosis Quística del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González durante el período de octubre 2011 a octubre 2014 a los cuales se les invitó a participar y cumplieron con los criterios de inclusión de éste protocolo de investigación.

#### **4.3 Criterios de inclusión de pacientes.**

- Carta de consentimiento informado firmado por el paciente y dos testigos en el caso de los pacientes mayores de edad, Consentimiento informado firmado por ambos padres y asentimiento informado del menor para aquellos pacientes menores de edad.
- Pacientes con diagnóstico confirmado de FQ dos pruebas de sudor con iontoforesis con pilocarpina y/o estudio genético con dos mutaciones conocidas).

#### **4.4 Criterios de exclusión**

- Pacientes con diagnóstico no confirmado de FQ.

- Pacientes con FQ y enfermedad hepática avanzada.
- Pacientes con FQ recibiendo esteroides sistémicos.
- Pacientes que no aceptaron colaborar en este estudio.

#### **4.5 Revisión de expedientes clínicos.**

Se elaboró una base de datos en la que se incluyeron parámetros demográficos, clínicos, bioquímicos, funcionales, de imágenes de los pacientes; dentro de los cuales se encuentra: edad, sexo, edad al diagnóstico, mutaciones identificadas, antecedentes de colonización con *P. aeruginosa*, Cultivos de expectoración y/o Exudado faríngeo, Score radiográfico, Score tomográfico, pruebas funcionales respiratorias, recuento de plaquetas, citosinas, Ac anti-Pseudomonas.

#### **4.6 Seguimiento de la evolución de los pacientes**

El protocolo de seguimiento en la clínica de FQ incluyó control mensual para pacientes provenientes de Monterrey y municipios aledaños. En pacientes provenientes de otros estados se hicieron controles cada tres meses. En estos controles se evaluó el estado nutricional a través de Peso, Talla, Índice de masa Corporal (IMC), síntomas clínicos respiratorios, saturación de oxígeno por pulsioximetría, química sanguínea una vez al año, Rx. de tórax una vez /año. La radiografía de Tórax se valoró con un score radiológico clásico en FQ, llamado Score radiológico de Brasfield (34). A partir de los 3 años de edad y

sucesivamente cada 3 años, se realiza Tomografía de Tórax de alta resolución y se valora con la puntuación de Bhalla (35).

La toma de muestra respiratoria se hizo en la visita inicial y se repitió cada tres meses, se tomaron muestras extras si el paciente presentaba síntomas respiratorios. Las muestras fueron obtenidas por expectoración espontánea si el paciente fue capaz de efectuarla o en su defecto por hisopado faríngeo profundo.

Las muestras de expectoración fueron procesadas en el Centro Regional de control de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina UANL. Las muestras se sembraron en agar chocolate, agar EMB, agar azida de sodio, agar estafilococo S110 y agar sangre. Los exudados faríngeos se siembran en agar sangre de carnero. Las placas de agar sangre y chocolate se incubaron en micro-aerobiosis y las demás se incubaron en aerobiosis hasta por 72 h a 36 °C. Las colonias se identificaron usando pruebas bioquímicas convencionales y mediante el sistema bioquímico API20 NE (Bio Mérieux).

Se realizaron test de función pulmonar a través de espirometría en el laboratorio de Función Pulmonar del Centro de Prevención y Rehabilitación de Enfermedades Pulmonares Crónicas CEPREP, siguiendo las guías de la American Thoracic Society (36). Las pruebas se realizaron en el Pletismógrafo MedGraphic - MGCdata Store Version 6.2 – Mac Breeze Database Versión 6.2.040 Los resultados fueron expresados como proporción o porcentaje de los valores predichos tanto para FEV1 como para FVC según sexo, edad y altura.

Los pacientes fueron tratados con las indicaciones habituales: dieta hipercalórica, enzimas pancreáticas, vitaminas liposolubles, nebulizaciones con broncodilatadores y Pulmozyme NR, terapia de aclaramiento de secreciones, antibióticos sistémicos si fue necesario y tratamiento dirigido a erradicar *P. aeruginosa* si se trató de infección inicial o reciente. El protocolo de erradicación se realizó con Tobramicina 300 mg por vía inhalatoria dos veces por día durante un mes.

El trabajo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación y quedó registrado con la Clave NM11015.

#### **4.7 Obtención de sangre periférica para los análisis en suero**

Se utilizaron las técnicas convencionales de extracción, mediante punción venosa y se recolectó 3 mL. de sangre en los tipos de tubos especificados para cada estudio.

Se utilizó la técnica convencional de obtención de suero a partir de sangre coagulada a partir de un tubo de vacutainer sin anticoagulante y se almacenó en 3 alícuotas de 1 mL. a -70°C hasta su uso.

#### **4.8 Análisis de parámetros en suero**

A todos los pacientes se les evaluó lo siguiente: recuentos plaquetarios, fracción CD40Ls, mediadores inflamatorios en sangre circulante: Interleucina 6 (IL 6), ICAM-1, Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por técnica de Elisa (Human Adipokine Panel

Prepotech) y medición de anticuerpos específicos contra *P. aeruginosa* través de kit CF-Ig. G (Elisa Statens Serum Institut SSI Diagnostica – Denmark).

Las muestras de sangre se analizaron en el laboratorio de la Unidad de Hígado del Departamento de Medicina Interna del Hospital Universitario. (Ver anexo)

#### **4.9 Análisis estadístico**

Se realizaron test paramétricos o no paramétricos según fuera apropiado. Se utilizó para comparar medias el test de Anova, se realizó una prueba de homogeneidad de varianzas numéricas. Para variables categóricas se utilizaron tablas de contingencia y chi cuadrada.

Para CD40Ls se realizó un área bajo la curva (ROC) para evaluar valores de corte de este marcador para predecir la colonización por *P. aeruginosa* dentro de los 6 meses de la visita en que se tomó la muestra.

Todos los valores se reportaron como promedios (desvíos estándar) e intervalos de confianza 95%. Un valor de  $P < 0.05$  se tomó como estadísticamente significativo. Para elaborar la base de datos se utilizó Excel 2007. Los datos fueron analizados con el programa SSPS 20.0 para Windows.

## Capítulo V

### RESULTADOS

En el periodo de estudio 64 pacientes fueron invitados a participar de los cuales, 60 cumplieron los criterios de inclusión y aceptaron participar en el protocolo previo consentimiento informado. Fueron excluidos tres pacientes cuyos familiares no dieron su consentimiento informado y un paciente con hepatopatía crónica e hiperesplenismo.

Se incluyeron 31 mujeres y 29 varones con un promedio de edad  $9,51 \pm 7.25$  años que concurren a la clínica.

El criterio de inclusión de diagnóstico de FQ por síntomas clínicos y Test de electrolitos en sudor  $>$  de 60 mmol/L estuvo presente en 54 pacientes y los restantes 6 fueron diagnosticados por tamiz neonatal positivo y electrolitos en sudor  $>$  de 60 mmol/L. La edad al momento del diagnóstico fue de  $43,6 \pm 65,4$  meses.

El estudio genético fue realizado y se logró identificar al menos una mutación en el CFTR en 49 de los 60 pacientes siendo Homocigotas para la mutación F508del 16/60 (26,7%) Heterocigotos para el F508del 21/60 (35%) y se identificaron dos mutaciones diferentes de F508del en 12/60 (20%). Figura 2

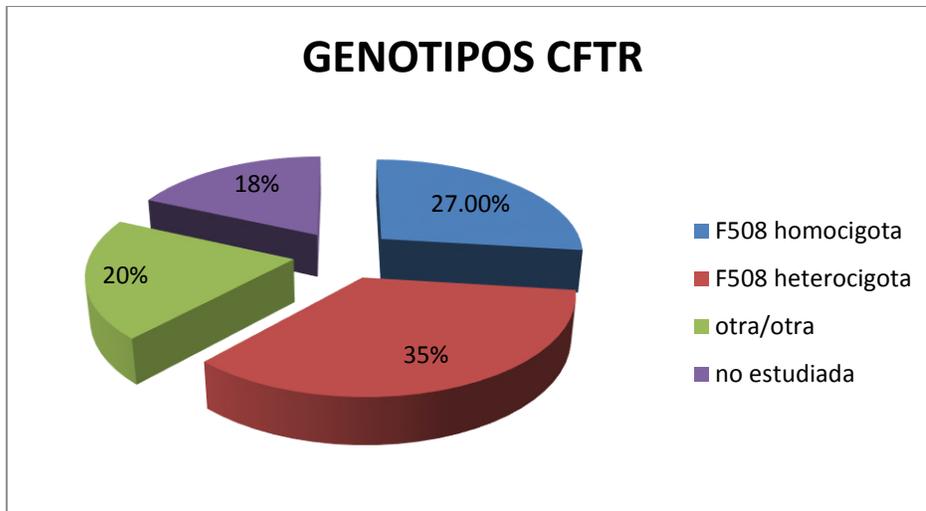


Figura 2- Distribución de genotipos de CFTR.

En cuanto al lugar de residencia de los pacientes 11/60 pacientes fueron de procedencia rural y los restantes viven en ambientes urbanos.

De acuerdo a la clasificación de Leed estaban crónicamente colonizados con *P. aeruginosa* 24 pacientes, 26 pacientes tenían colonización intermitente y habían recibido tratamiento de erradicación según guías internacionales y en 10 pacientes nunca se aisló hasta el momento del estudio dicha bacteria en sus secreciones respiratorias y/o exudado faríngeo.

Otras bacterias detectadas al menos una vez en el año previo al estudio fueron *Staphylococcus aureus* Meticilino Sensible en 55 pacientes (91%) *Staphylococcus aureus* MetiR en 3 pacientes (5%), *Stenotrophomonas maltophilia* en 3 (5%) *Achromobacter xylosoxidans* en 4 (6%), Enterobacterias en 3 (5%), *Burkholderia gladioli* /60, *Aspergillus fumigatus* 2 /60.

Los pacientes fueron divididos a los fines del análisis en grupos: Grupo 1: Pacientes diagnosticados por Tamiz Neonatal, y/o pacientes en quienes nunca

se detectó *P. aeruginosa*, Grupo 2: Pacientes que tuvieron algún aislamiento de *P. aeruginosa* pero no tuvieron colonización crónica y Pacientes Grupo 3: aquellos que tuvieron colonización crónica por *P. aeruginosa*.

Las características generales del grupo de pacientes con fibrosis quística se muestran en la tabla 1.

**Tabla1: Características generales pacientes con fibrosis quística**

| <b>Características</b> | <b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> Crónica (n:24)</b> | <b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> Intermitente (n:26)</b> | <b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> Nunca detectada (n:10)</b> | <b>P</b> |
|------------------------|---|--|---|----------|
| <b>Edad</b> (meses)    | 58.8 (1-292)  | 22.31 (1-348)  | 62.1 (1-180)  | 0.086    |
| <b>BMI</b>             | 16.5±3.72   | 15.78 ± 2.46   | 17 ±2.23  | 0.620    |
| <b>Sexo</b>            |   |  |   |          |
| Varones                | 11(37.9%)   | 11 (37.9%)   | 7 (24.1%)   |          |
| Mujeres                | 13(41.9%)   | 15 (48.4%)   | 3 (9.7%)  |          |
| <b>Hogar</b>           |   |  |   |          |
| Rural                  | 3(27.5%)  | 3 (27.5%)  | 5 (45%)   | 0.018    |
| Urbano                 | 21(42.9%)   | 23(46.9%)  | 5 (10.2%)   |          |

El medio ambiente rural demostró en el presente estudio proteger al paciente FQ y aumentó la posibilidad de que no estuviera colonizado con *P.aeruginosa* en contraparte a los pacientes de hogares urbanos.

En la tabla 2 se muestra la relación existente entre las citocinas y/o marcadores utilizados en relación a cada uno de los grupos destacando los niveles de anticuerpos anti *P. aeruginosa* y del CD40Ls como marcadores de la infección por *P. aeruginosa* y sobre todo de la colonización crónica.

**Tabla 2 Comparación de citocinas y marcadores con infección por *P.aeruginosa* crónica / no crónica / nunca infectado.**

| Citocina y/o Marcador               | P. a. Crónica (n:24)   | P.a. No crónica (n:26) | No infectado (n:10)   | IC 95%   | p                             |
|-------------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|--|-------------------------------|
| <b>TNF<math>\alpha</math> pg/mL</b> | 49.4<br>$\pm$ 15.3     | 48.4<br>$\pm$ 9.8      | 59.8<br>$\pm$ 28.8    | Crónica (42.9-55.9)<br>No Crónica (44.4-52.4)<br>No infección (39.2-80.4)        | <b>0.491</b>                  |
| <b>IL-6 pg/mL</b>                   | 232.1<br>$\pm$ 388.8   | 279.3<br>$\pm$ 436.9   | 301.7<br>$\pm$ 436.9  | Crónica (67.9-396.3)<br>No crónica (116.3-442-3)<br>No infecc. (10.78-614.3)     | <b>0.872</b>                  |
| <b>ICAM-1 pg/mL</b>                 | 1237<br>$\pm$ 82.7     | 1229<br>$\pm$ 196.2    | 1387<br>$\pm$ 313.2   | Crónica (1202-1271.4)<br>No crónica (1148-1308.3)<br>No infecc. (1208.7-1308.6)  | <b>0.344</b>                  |
| <b>VEGF pg/mL</b>                   | 236.5<br>$\pm$ 382.2   | 130.8<br>$\pm$ 148.1   | 88.64<br>$\pm$ 71.3   | Crónica (75.12-397.8)<br>No crónica (71.01-190.62)<br>No infecc. (37.6-139.7)    | <b>0.277</b>                  |
| <b>CD40Ls pg/mL</b>                 | 1530.9<br>$\pm$ 1162.3 | 2243.6<br>$\pm$ 1475.9 | 1008.1<br>$\pm$ 746.8 | Crónica (1040-2021.7)<br>No crónica (1647.4-2839.7)<br>No infecc. (473.9-1542.5) | <b>0.010</b>                  |
| <b>Ac Pa Unit</b>                   | 11.6<br>$\pm$ 2.15     | 5.7<br>$\pm$ 2.68      | 3.5<br>$\pm$ 1.8      | Crónica (10.7-12.53)<br>No crónica (4.6-6.8)<br>No infecc. (2.15-4.77)           | <b><math>\leq</math>0,001</b> |
| <b>Plaquetas</b>                    | 363.9<br>$\pm$ 120.2   | 369.7<br>$\pm$ 95.3    | 306<br>$\pm$ 79.1     | Crónica (313.2-414.7)<br>No crónica (331.2-408.3)<br>No infecc.(329-383.84)      | <b>0.243</b>                  |

**TNF** Factor de necrosis tumoral alfa, **IL6** Interleucina 6. **Ac.Pa** anticuerpo anti *P.aeruginosa*, **ICAM-1**moléculas de adhesión, **VEGF** Factor de crecimiento endotelial vascular.

En la tabla 3 se evaluó la repercusión que la infección colonización por *P. aeruginosa* tuvo sobre el deterioro pulmonar medido tanto con las pruebas de función pulmonar como con los estudios radiográficos y tomográficos.

**Tabla 3: Comparación de infección por *P. aeruginosa* crónica/no crónica / no infección vs función pulmonar y estudio de imágenes.**

| <b>F. pulmonar</b>                            | <b>Crónica (n:23)</b> | <b>No crónica (n:17)</b> | <b>No infección (n:6)</b> | <b>CI 95%</b>   | <b>P</b> |
|---|-----------------------|--------------------------|---------------------------|---|----------|
| <b>FEV1 (%) (n:46/60)</b>                     | 57±26                 | 88±16                    | 85±19                     | Crónica (45-68)<br>No crónica (79-96)<br>No infecc. (64-106)          | ≤0,001   |
| <b>FVC (%) (n: 46/60)</b>                     | 69±21                 | 90 ±15                   | 94±9                      | Crónica (59-79)<br>No crónica(82-98)<br>No infecc.(84-104)            | ≤ 0.001  |
| <b>Bronquiectasias en TAC (Bhalla) (n:48)</b> | 4.2±1.9               | 1.7±1.8                  | 1.4±1.8                   | Crónica (3.35-5.1)<br>No crónica(.81-2.64)<br>No infecc.(1.7-2.92)    | ≤0.001   |
| <b>Score Bhalla TAC (n: 48/60)</b>            | 11.2±5.1              | 5.5±4.7                  | 3.9±4.1                   | Crónica (8.9-13.5)<br>No crónica (3.18-7.8)<br>No infecc.(0.46-7.3)   | ≤ 0.001  |
| <b>Brasfield Rx. tórax (n:60)</b>             | 17.9±3.4              | 22.8 ±2.1                | 23.4±2.2                  | Crónica (16.5-19.4)<br>No crónica(21.4-23.1)<br>No infecc.(21.9-24.9) | ≤ 0.001  |

Las medianas de CD40Ls para cada uno de los grupos evaluados son mostradas en la figura 3.

### CD40Ls

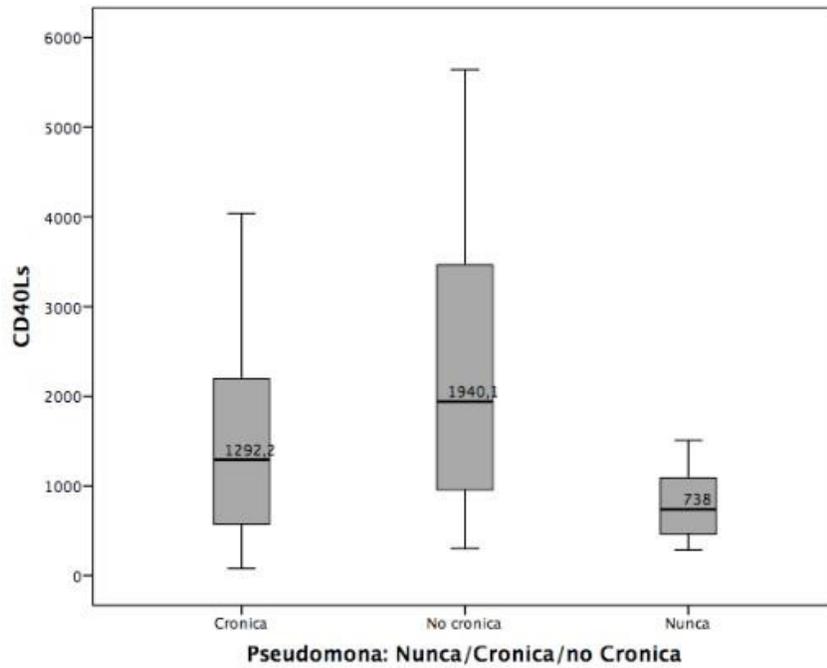


Figura 3: Medianas de CD40Ls en los tres grupos de pacientes FQ.

El rendimiento del CD40Ls fue optimizado utilizando un valor de corte de 1255 pg/mL, con un área bajo la curva ROC (Receiver Operating Characteristic) de 0,84 IC (95%: 0,71 -0.89). Figura 4

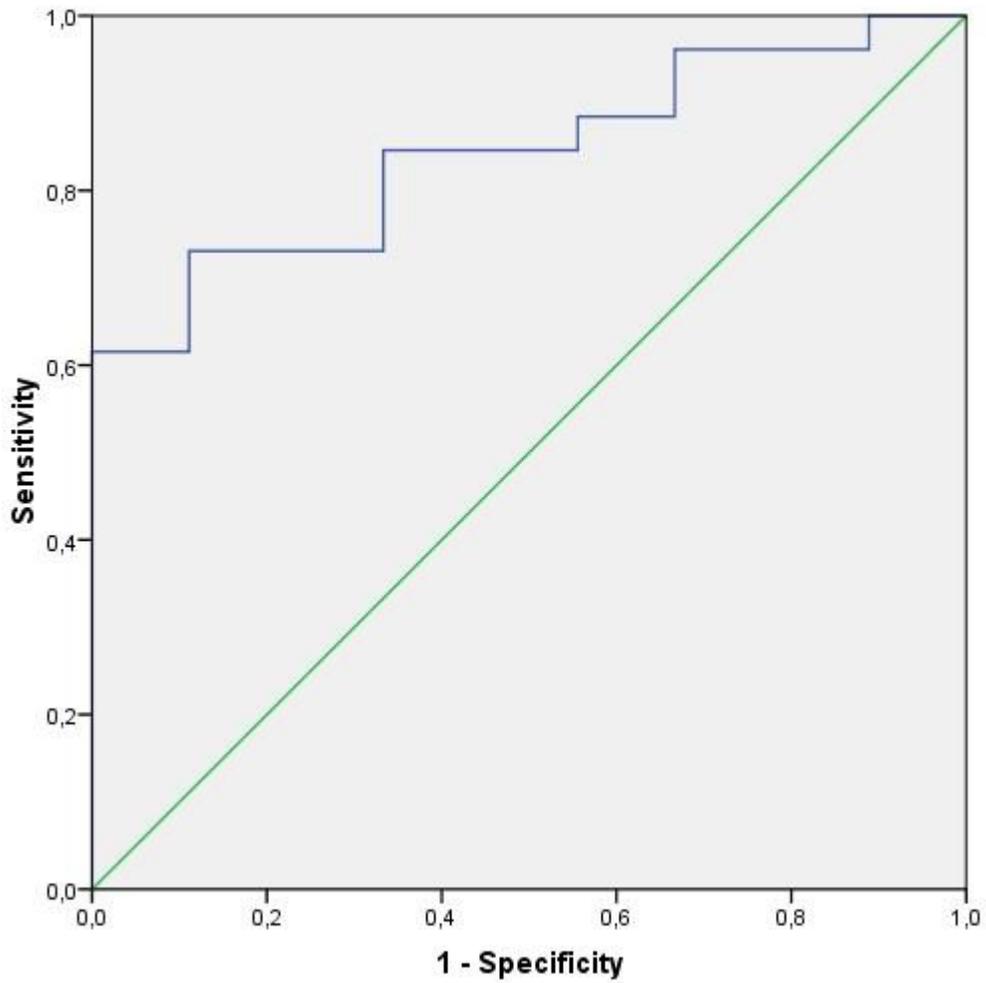


Figura 4: La curva ROC muestra las características de la asociación entre los niveles de CD40Ls y la presencia de *P. aeruginosa* en pacientes con F.Q. Área bajo la curva (AUC) fue 0.84 (95% IC 0.71–0.97).

## Capítulo VII

### DISCUSIÓN

La enfermedad pulmonar en FQ se caracteriza por una destrucción progresiva del tejido pulmonar debido a infección bacteriana, inflamación y remodelación de la vía aérea.

La infección por *P. aeruginosa* es responsable de la elevada morbilidad y mortalidad entre estos pacientes. Los pacientes infectados con esta bacteria generalmente muestran una reducción de cerca de 10 años en su expectativa de vida cuando se los compara con los no infectados.

Para evitar esta colonización crónica es importante detectarla precozmente y con intervenciones tempranas lograr eliminarla de la vía aérea para retardar la colonización crónica y el daño subsecuente.

La detección de *P. aeruginosa* se realiza a través de cultivos de expectoración, sin embargo muchos pacientes -especialmente niños pequeños- son incapaces de expectorar. La broncoscopia y lavado bronco-alveolar es una alternativa, pero es invasiva y solo se emplea cuando otros abordajes han fracasado.

Por esta razón el exudado oro-faríngeo es utilizado en reemplazo del esputo o del LBA. Este exudado muestra la flora de la vía aérea superior que se asume refleja la del tracto respiratorio inferior.

La dificultad para obtener una muestra respiratoria representativa de la vía aérea en lactantes y niños pequeños habla de la necesidad de utilizar métodos que puedan complementar o ser una alternativa a los cultivos.

Un ejemplo de estos métodos auxiliares es la detección de anticuerpos séricos contra *P. aeruginosa*, sin embargo su uso en la práctica clínica permanece controvertido.

La búsqueda de mediadores que puedan ser utilizados como marcadores del daño pulmonar y de la presencia de *P. aeruginosa* en la vía aérea del paciente con FQ es de suma importancia para el seguimiento de estos pacientes.

En este estudio, hemos examinado varias citosinas biológicamente plausibles de evaluar la actividad de la enfermedad y que se pueden medir en la circulación sistémica. La sangre es un compartimiento biológico atractivo para la medición de marcadores en FQ ya que puede ser obtenida de forma mínimamente invasiva en la mayoría de los laboratorios y tiene el potencial para la aplicación clínica en pacientes de todas las edades y con todas las etapas de gravedad de la enfermedad pulmonar.

Por ello y dado el aumento observado en los recuentos plaquetarios de nuestros pacientes con FQ ante la primera infección detectada por *P. aeruginosa* es que buscamos demostrar la activación de estas verdaderas células inmunes en ese contexto.

Las plaquetas están íntimamente ligadas con la coagulación y la inflamación, y pueden ser activadas por complejos antígeno-anticuerpo, por microorganismos y endotoxinas incluyendo el lipopolisacárido de *P. aeruginosa*. Después de su activación interactúan con las células endoteliales y con los leucocitos circulantes a través de mediadores y contribuyen importantemente a la

iniciación y propagación de enfermedades y procesos como es el caso de la enfermedad pulmonar en FQ

Ya se ha demostrado que la activación plaquetaria se produce en el paciente con FQ y se correlaciona con el compromiso pulmonar (15, 19).

El 95% del CD40Ls es liberado por plaquetas activadas(14) y su interacción con el receptor CD40 juega un importante rol en la inducción de la respuesta inmune humoral y celular eficiente. Las moléculas co-estimuladoras incluyendo el CD40L, son capaces de regular la inflamación, y sus niveles sanguíneos así como sus isoformas solubles pueden servir como marcadores de actividad en diversas condiciones patológicas, incluyendo sepsis(37), tuberculosis(38), and enfermedades parasitarias(39) entre otras. Los pacientes con FQ tienen una intensa inflamación sistémica en las que las plaquetas están involucradas. Las plaquetas pueden ser activadas por complejos antígeno-anticuerpos, microorganismos y endotoxinas como el lipopolisacárido de *P. aeruginosa* (18, 40).

Los valores normales del CD40Ls en sujetos sanos oscilan entre 0.16-10 Ng/mL(41) Falco y col(19) demostraron que los pacientes con FQ tienen incremento de los niveles de CD40Ls en sangre circulante en comparación con controles sanos y que esos niveles están inversamente relacionados con el deterioro de la función pulmonar evaluada a través del FEV1, aunque en este estudio todos los pacientes menos uno tenían colonización crónica con *P. aeruginosa*. Los autores concluyen que el CD40Ls podría representar el link

biomarcador entre el estado inflamatorio, y el daño endotelial que conduce a un progresivo daño de la función pulmonar (19).

En el presente estudio los pacientes fueron divididos en tres grupos de acuerdo al estado de la infección por *P. aeruginosa* y esto nos permitió evaluar la relación del CD40Ls con la presencia o ausencia del patógeno. Los pacientes con FQ mostraron cambios en los niveles séricos del CD40Ls y estos cambios fueron asociados con la presencia de *P. aeruginosa* en los cultivos.

El rendimiento del CD40Ls fue optimizado utilizando un valor de corte de 1255 pg/mL con un área bajo la curva ROC de 0,84 IC (95%: 0,71 -0.89) para la identificación de los pacientes que experimentaron una infección por *P. aeruginosa*.

En aquellos pacientes que no tuvieron colonización crónica por *P. aeruginosa* y experimentaron un cultivo positivo dentro de los seis meses de la muestra inicial y recibieron tratamiento de erradicación con Tobramicina inhalada se les tomó una segunda muestra al finalizar dicho tratamiento observando una reducción estadísticamente significativa  $p < 0.045$  en los niveles de la molécula co-estimuladora estudiada.

En el presente estudio los pacientes mostraron un comportamiento similar, a aquellos del trabajo de Falco y col.(19) con una relación inversa entre los niveles de CD40Ls y parámetros de daño pulmonar como los test de función pulmonar y el compromiso evidenciado en los estudios de imágenes.

Los niveles de CD40L s fueron más elevados en el grupo de pacientes con infección intermitente que en aquellos con colonización crónica. Una posible explicación es que la mayoría de los pacientes crónicamente colonizados estaban tratados con Tobramicina inhalada en ciclos ON-OFF, que puede reducir la inflamación (42) y secundariamente los niveles de CD40Ls . Esto sugiere que medir en forma seriada los niveles de CD40Ls en pacientes con FQ puede ser útil en el seguimiento de los mismos y ayudar a tomar decisiones de tratamiento, además la persistencia de valores elevados del CD40Ls puede reflejar una falta de respuesta o resistencia al tratamiento y la necesidad de cambiar o intensificarlo. Títulos elevados de CD40Ls y cultivos oro-faríngeos o de expectoración negativos deben alertarnos a realizar una búsqueda más exhaustiva de la posible infección.

Las restantes citosinas estudiadas no mostraron una relación entre sus niveles sanguíneos y el estado de infección-colonización por P aeruginosa.

## Capítulo VII

### 7. CONCLUSIÓN

En conclusión estos hallazgos sugieren que el CD40Ls puede ser un marcador de la presencia de *P. aeruginosa* en la vía aérea de pacientes con FQ y del daño pulmonar progresivo, y que junto a otros marcadores puede constituir un panel para mejorar la detección de este patógeno así como de la recaídas infecciosas y del deterioro pulmonar.

Es de destacar que el medio ambiente rural demostró en el presente estudio proteger al paciente FQ y aumentó la posibilidad de que no estuviera colonizado con *Pseudomonas aeruginosa* en relación a los pacientes urbanos, aunque dado el pequeño tamaño de la muestra se necesitan efectuar más estudios al respecto.

Futuras investigaciones son necesarias para evaluar si el CD40Ls puede servir como biomarcador y potencial blanco terapéutico en el paciente con FQ.

## Capitulo VIII

### 8. ANEXOS

#### **Determinación de Anticuerpos IgG anti-pseudomonas por ELISA**

Se empleó un kit para la medición cuantitativa del nivel de anticuerpos contra *P. aeruginosa* en muestras de suero humano. El kit ELISA PSEUDOMONAS-CF-IgG es un ELISA tradicional. Más de 64 antígenos diferentes son detectables en el pool antígeno. Los resultados a partir del pool de suero estándar humano se utilizó para calcular la concentración en la muestra del paciente.

*El kit de Anticuerpos IgG anti-pseudomonas contiene:*

- 1 Maxisorp placa ELISA (NUNC®) (almacenar a temperatura ambiente)
- 9 mg de antígeno liofilizado (almacenar a temperatura ambiente)(Tratamiento con ultrasonidos de *P. aeruginosa* serotipos O-1 a S-17)
- 1 vial de un pool de antisuero estándar humano (conservar a temperatura ambiente) (anticuerpos contra *P. aeruginosa*)
- 0,5 ml de agua destilada estéril (conservar a temperatura ambiente)
- 12 ml buffer de recubrimiento (almacenar a temperatura ambiente)
- 250 ml de solución de lavado (conservar a temperatura ambiente)
- 250 ml de buffer de dilución (conservar a temperatura ambiente)
- IgG HRP 0,1 ml de conejo anti-humano (conservar a 2-8 ° C)

- 12 de ácido sulfúrico ml (2M) (almacenar a temperatura ambiente)
- 12 ml de TMB Plus Sustrato (conservar a 2-8 ° C)

### Equipamiento requerido

- Lector de ELISA ajustado a 450 nm.

### Procedimiento

#### 1. Procedimiento de ELISA

Las muestras de antisuero estándar y las muestras de los pacientes se analizaron por duplicado (Figura 1).

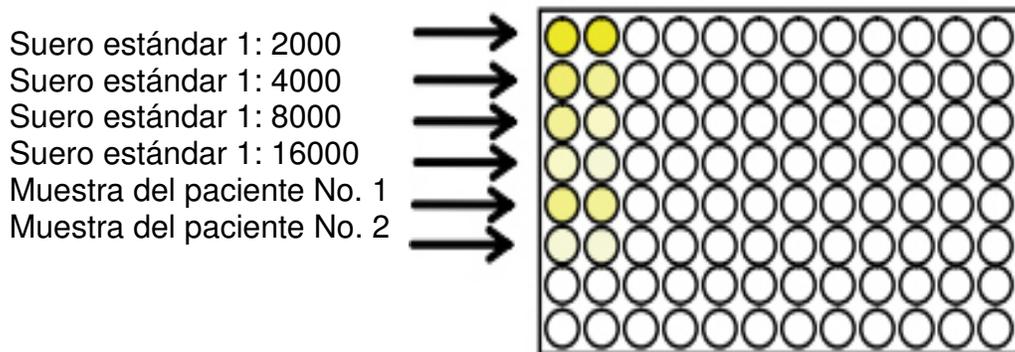


Figura 1. Ejemplo de una configuración.

### Preparación de diluciones

Solución A: solución de antígeno para recubrimiento de placas de ELISA (uso en la etapa 1)

- Se añadió 100  $\mu$ L de agua destilada estéril al vial que contenía 9 mg de antígeno-CF-IgG pseudomonas hasta disolver el antígeno liofilizado.
- Diluyó la cantidad a utilizar 1: 2000 en buffer de recubrimiento.
- Diluyó solamente la cantidad que se utilizará el mismo día.
- Guardó el antígeno diluido para acciones restantes a - 20°C.
- La solución madre se congeló.

Solución B: dilución del antisuero estándar humana (uso en la etapa 3)

- Añadió 100 uL de agua destilada estéril al vial con el antisuero humana normal, y hasta disolver el antisuero.
- Se diluyó el antisuero estándar humano 1: 2.000, 1: 4.000, 1: 8.000 y 1: 16.000 en buffer de dilución.
- Se diluyó solamente la cantidad que se utilizaría el mismo día.
- Se guardó el restante antisuero estándar humano sin diluir a - 20°C.

Solución C: dilución del antisuero paciente (uso en la etapa 3)

- El antisuero del paciente fue diluido 1: 100 en buffer de dilución (Ejem. 10 uL antisuero añadido a 990 uL de buffer de dilución).
- Se diluyeron solo las muestras a medir el mismo día.

Solución D: Dilución de conejo anti-humano IgG HRP (uso en la etapa 4)

- La IgG HRP de conejo anti-humano fue diluida 1: 20.000 en buffer de dilución (Ejem.. 1 uL de conejo anti-humano Ig.G HRP se añadió a 20 mL de buffer de dilución) y se mezcló fuertemente.

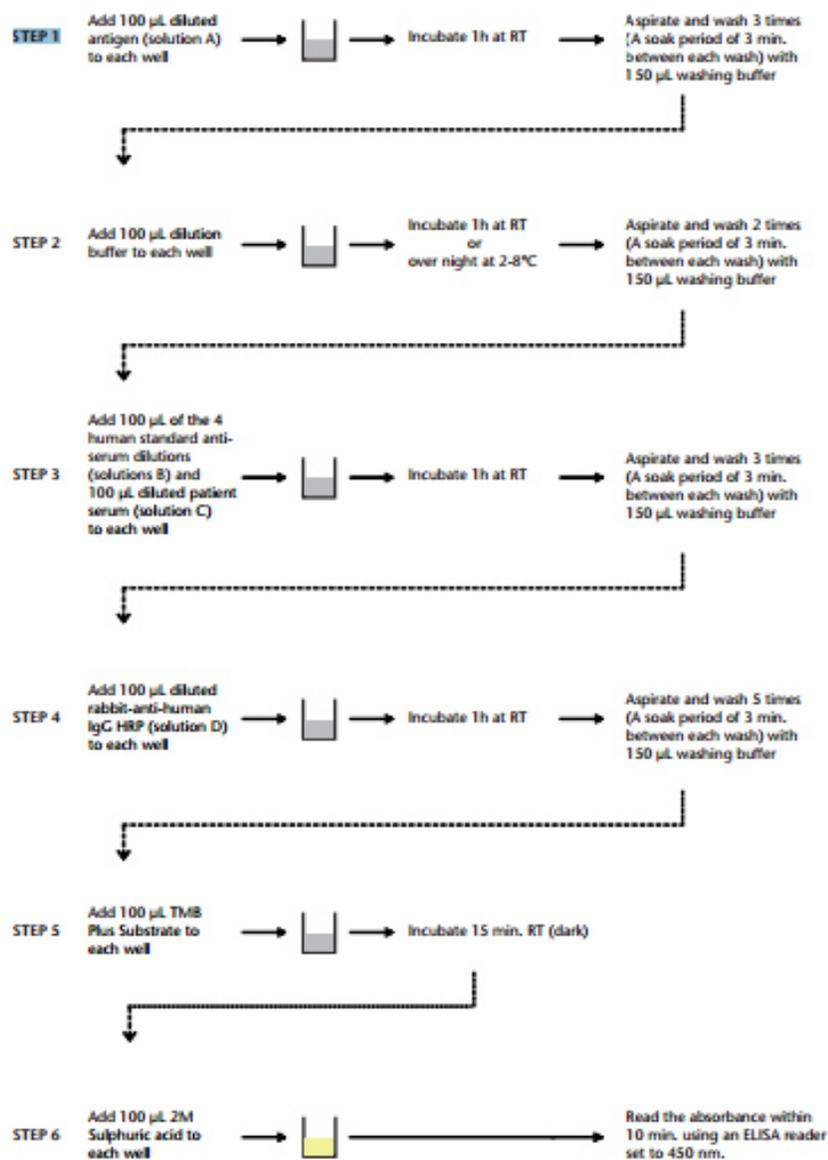


Figura 2. Protocolo de ELISA para la cuantificación de Anticuerpos IgG anti-*P. aeruginosa*.

### Cálculo de los resultados

La absorbancia de las diluciones de antisuero estándar humanos se utilizó para construir una curva estándar. A continuación se ilustra un ejemplo de cálculo de datos. La muestra antisuero estándar humano 1: 1000 es igual a 100 unidades de ELISA. Cálculo de las unidades de ELISA para las diluciones de 1: 2000 a 1: 16000 fueron las siguientes:

| Factor de dilución del suero estándar humano | Unidad ELISA | Valor DO-450 |
|--|--------------|--------------|
| 1:2000                                       | 50.00        | 2.34         |
| 1:4000                                       | 25.00        | 1.71         |
| 1:8000                                       | 12.50        | 1.13         |
| 1:16000                                      | 6.25         | 0.71         |

Se obtuvo la curva estándar como se muestra a continuación a una DO450 vs unidad de ELISA. La línea de regresión de los puntos debe ser lineal (Figura 3).

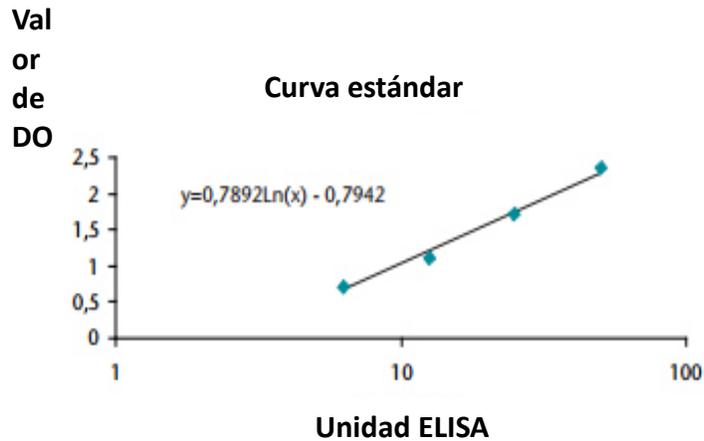


Figura 3. Curva estándar de Anticuerpos IgG anti-pseudomonas

Los valores de DO450 de las muestras de los pacientes fueron convertidos a unidades ELISA usando la ecuación de la curva estándar.

$$\text{Valor DO 450} = 0.7892\ln(\text{unidad ELISA}) - 0.7942$$



$$\text{Unidad ELISA} = \text{EKSP} \left( \frac{\text{valor DO 450} + 0.7942}{0.7892} \right)$$

Dado que la muestra del paciente se diluyó 10 veces menos que el antisuero estándar humano, la unidad ELISA fue dividido por 10 (Ejemplo Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplo del cálculo de las muestras

| Paciente | Valor de DO-450 de muestras de pacientes | Unidad ELISA | Unidad ELISA /10 |
|----------|--|--------------|------------------|
| 1        | 2.60                                     | 73.96        | 7.396            |

|   |      |       |       |
|---|------|-------|-------|
| 2 | 0.53 | 5.35  | 0.535 |
| 3 | 1.96 | 32.78 | 3.278 |
| 4 | 0.89 | 8.45  | 0.845 |

### Interpretación de resultados

El valor normal de la unidad de ELISA de las personas no infectadas de *P. aeruginosa* IgG es  $0,66 \pm 1,64$  (media  $\pm$  2 veces la desviación estándar). Por lo tanto, el límite normal es de 2.30 y un aumento de título significativo en comparación con controles normales es  $>2.30$ .

|                          | Cultivo positivo para <i>P. aeruginosa</i> | Cultivo negativo para <i>P. aeruginosa</i> |
|--------------------------|--|--|
| Unidad IgG ELISA $>2.96$ | A  | B  |
| Unidad IgG ELISA $<2.96$ | C  | D  |

Grupo A: Probablemente infección crónica por *P. aeruginosa*

Grupo B: Probable NO infección crónica por *P. aeruginosa*, pero sugiere cultivo de repetición

Grupo C: Probablemente colonización intermitente por *P. aeruginosa*.

Grupo D: Probablemente no colonización por *P. aeruginosa* o infección crónica

### Determinación de FNT alfa, IL-6, ICAM-1, VEGF y CD40Ls por ELISA

#### sándwich

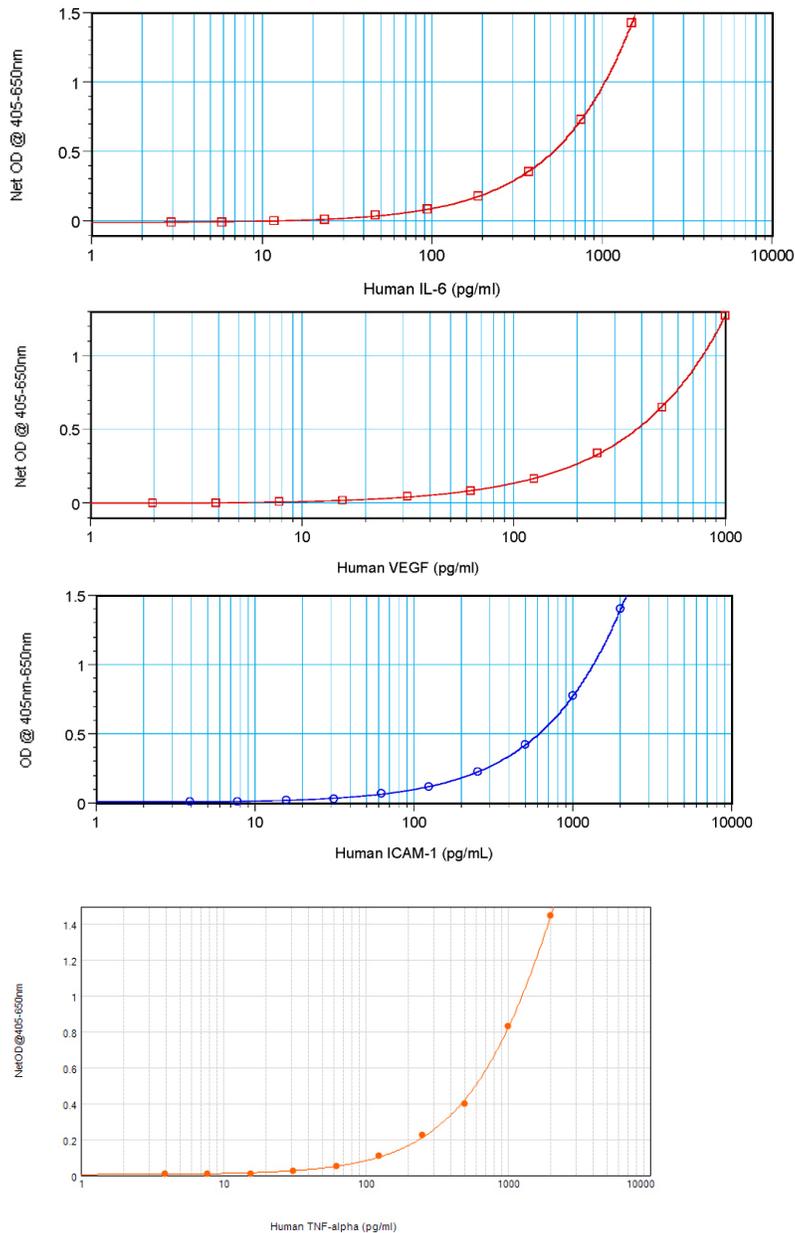
Para la determinación de cada una de estos mediadores se empleó un kit de ELISA con su respectivo anticuerpo de captura para cada uno de ellos a través de la técnica de ELISA sándwich de la marca PREPOTECH con la cual se procedió a obtener una curva de calibración para cada una de ellas y posteriormente a la cuantificación de las muestras de los pacientes. (Figura 4)

El ensayo inmunoenzimático ligado a enzima (ELISA) es una técnica de laboratorio para cuantificar la concentración de antígenos específicos en el sueros de los pacientes, en el cual un soporte de unión en fase sólida (placa de poliestireno) se utilizó para capturar el antígeno de prueba, que se detectó a continuación, con la ayuda de un anticuerpo específico ligada a enzima (E-Ab). El protocolo de detección implicó la conversión de una solución de sustrato incoloro en un intenso, este producto de color se midió directamente en la placa de reacción. El aumento de la densidad óptica durante la reacción se registró a diferentes puntos de tiempo para varias diluciones de la muestra, y los datos recogidos se utilizaron junto con una curva estándar para calcular la concentración del antígeno en las muestras de suero de los pacientes.

Los pasos generales para estas cuantificaciones fueron:

- Se diluyó es estándar (para cada mediador) en diluyente. Inmediatamente se adicionó 100 uL de estándar o muestra a cada pocillo por triplicado y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas.
- Se aspiró y lavo 4 veces, se diluyo el anticuerpo de detección en diluyente a la concentración específica para cada mediador y se adiciono 100 uL por pocillo.
- Se aspiró y lavo 4 veces. Se diluyo la avidina peroxidada en diluyente 1:2000 para un volumen total de 11 mL y se adicionó 100 uL por pocillo y se incubo 30 minutos.
- Aspiró y lavo 4 veces y se adicionó 100 uL de solución de sustrato a cada pocillo, se incubo a temperatura ambiente para desarrollo de color

leyéndose en un lector de placas a las diversas longitudes de onda de acuerdo a cada mediador. Se obtuvo una curva estándar y de acuerdo a esta se calculó la concentración de cada mediador respectivamente (Figura 4).



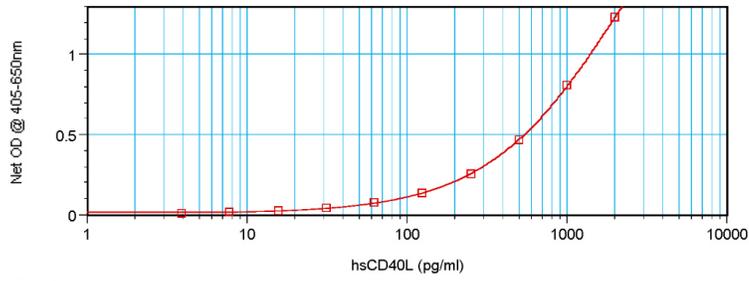


Figura 4. Curvas estándar para **FNT alfa, IL-6, VEGF, ICAM-1 y CD40Ls** por **ELISA sándwich**

## Capítulo IX

### 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Akabas MH. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. *J Biol Chem*. 2000 Feb 11;275(6):3729-32.
2. Segal E, Renteria F, Fernandez A. *Genética. Fibrosis Quística*. Buenos Aires: Ediciones Journal; 2004. p. 5-46.
3. Hudson VM. Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione (GSH) transport caused by CFTR mutation. *Free Radic Biol Med*. 2001 Jun 15;30(12):1440-61.
4. Ostedgaard LS, Baldursson O, Welsh MJ. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel by its R domain. *J Biol Chem*. 2001 Mar 16;276(11):7689-92.
5. Hospital for Sick Children in Toronto. Cystic Fibrosis Mutation Database. 2011 [cited 2016 Mar 18]; Available from: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>.
6. Cystic Fibrosis Foundation. Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). 2016 [cited 2016 Mar 18]; Available from: <http://www.cftr2.org/>.
7. Bell SC, De Boeck K, Amaral MD. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: promises, progress, pitfalls. *Pharmacol Ther*. 2015 Jan;145:19-34.
8. Heijerman H. Infection and inflammation in cystic fibrosis: a short review. *J Cyst Fibros*. 2005 Aug;4 Suppl 2:3-5.
9. Tirouvanziam R, Khazaal I, Peault B. Primary inflammation in human cystic fibrosis small airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Aug;283(2):L445-51.
10. Koch C. Early infection and progression of cystic fibrosis lung disease. *Pediatr Pulmonol*. 2002 Sep;34(3):232-6.
11. Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, Laxova A, West SE, Green CG, et al. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA*. 2005 Feb 2;293(5):581-8.
12. Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost*. 2003 Sep;1(9):1897-905.
13. O'Sullivan BP, Michelson AD. The inflammatory role of platelets in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Mar 1;173(5):483-90.
14. Blumberg N, Spinelli SL, Francis CW, Taubman MB, Phipps RP. The platelet as an immune cell-CD40 ligand and transfusion immunomodulation. *Immunol Res*. 2009 Dec;45(2-3):251-60.
15. O'Sullivan BP, Linden MD, Frelinger AL, 3rd, Barnard MR, Spencer-Manzon M, Morris JE, et al. Platelet activation in cystic fibrosis. *Blood*. 2005 Jun 15;105(12):4635-41.
16. Sturm A, Hebestreit H, Koenig C, Walter U, Grossmann R. Platelet proinflammatory activity in clinically stable patients with CF starts in early childhood. *J Cyst Fibros*. 2010 May;9(3):179-86.
17. Konig B, Jaeger KE, Konig W. Induction of inflammatory mediator release (12-hydroxyeicosatetraenoic acid) from human platelets by *Pseudomonas aeruginosa*. *Int Arch Allergy Immunol*. 1994 May;104(1):33-41.

18. König B, Jaeger KE, Sage AE, Vasil ML, König W. Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes, and monocytes). *Infect Immun*. 1996 Aug;64(8):3252-8.
19. Falco A, Romano M, Iapichino L, Collura M, Davi G. Increased soluble CD40 ligand levels in cystic fibrosis. *J Thromb Haemost*. 2004 Apr;2(4):557-60.
20. Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Registry Annual Data Report. 2013 [cited 2016 Mar 12]; Available from: [https://www.cff.org/2013\\_CFF\\_Patient\\_Registry\\_Annual\\_Data\\_Report.pdf](https://www.cff.org/2013_CFF_Patient_Registry_Annual_Data_Report.pdf).
21. Pressler T, Frederiksen B, Skov M, Garred P, Koch C, Hoiby N. Early rise of anti-pseudomonas antibodies and a mucoid phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* are risk factors for development of chronic lung infection--a case control study. *J Cyst Fibros*. 2006 Jan;5(1):9-15.
22. Nixon GM, Armstrong DS, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A, Robertson CF, et al. Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2001 May;138(5):699-704.
23. Farrell PM, Collins J, Broderick LS, Rock MJ, Li Z, Kosorok MR, et al. Association between mucoid *Pseudomonas* infection and bronchiectasis in children with cystic fibrosis. *Radiology*. 2009 Aug;252(2):534-43.
24. Henry RL, Mellis CM, Petrovic L. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is a marker of poor survival in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1992 Mar;12(3):158-61.
25. Pittman JE, Calloway EH, Kiser M, Yeatts J, Davis SD, Drumm ML, et al. Age of *Pseudomonas aeruginosa* acquisition and subsequent severity of cystic fibrosis lung disease. *Pediatr Pulmonol*. 2011 May;46(5):497-504.
26. Starner TD, McCray PB, Jr. Pathogenesis of early lung disease in cystic fibrosis: a window of opportunity to eradicate bacteria. *Ann Intern Med*. 2005 Dec 6;143(11):816-22.
27. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Oct 15;168(8):918-51.
28. Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, et al. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 2001 Feb 1;183(3):444-52.
29. Hoiby N, Frederiksen B, Pressler T. Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Cyst Fibros*. 2005 Aug;4 Suppl 2:49-54.
30. Douglas TA, Brennan S, Gard S, Berry L, Gangell C, Stick SM, et al. Acquisition and eradication of *P. aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2009 Feb;33(2):305-11.
31. Cabral DA, Loh BA, Speert DP. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* resists nonopsonic phagocytosis by human neutrophils and macrophages. *Pediatr Res*. 1987 Oct;22(4):429-31.
32. da Silva Filho LV, Tateno AF, Martins KM, Azzuz Chernishev AC, Garcia Dde O, Haug M, et al. The combination of PCR and serology increases the diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2007 Oct;42(10):938-44.
33. Pressler T, Karpati F, Granstrom M, Knudsen PK, Lindblad A, Hjelte L, et al. Diagnostic significance of measurements of specific IgG antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* by three different serological methods. *J Cyst Fibros*. 2009 Jan;8(1):37-42.
34. Brasfield D, Hicks G, Soong S, Tiller RE. The chest roentgenogram in cystic fibrosis: a new scoring system. *Pediatrics*. 1979 Jan;63(1):24-9.
35. Bhalla M, Turcios N, Aponte V, Jenkins M, Leitman BS, McCauley DI, et al. Cystic fibrosis: scoring system with thin-section CT. *Radiology*. 1991 Jun;179(3):783-8.

36. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*. 2005 Aug;26(2):319-38.
37. Lorente L, Martin MM, Varo N, Borreguero-Leon JM, Sole-Violan J, Blanquer J, et al. Association between serum soluble CD40 ligand levels and mortality in patients with severe sepsis. *Crit Care*. 2011;15(2):R97.
38. Hur YG, Kang YA, Jang SH, Hong JY, Kim A, Lee SA, et al. Adjunctive biomarkers for improving diagnosis of tuberculosis and monitoring therapeutic effects. *J Infect*. 2015 Apr;70(4):346-55.
39. Subauste CS. CD40 and the immune response to parasitic infections. *Semin Immunol*. 2009 Oct;21(5):273-82.
40. Coutinho IR, Berk RS, Mammen E. Platelet aggregation by a phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *Thromb Res*. 1988 Sep 1;51(5):495-505.
41. Metwalley KA, Farghaly HS, El-Saied AR. Assessment of serum levels of soluble CD40L in Egyptian children and adolescents with type 1 diabetes mellitus: Relationship to microalbuminuria and glycemic control. *Indian J Endocrinol Metab*. 2013 Nov;17(6):1024-9.
42. Husson MO, Wizla-Derambure N, Turck D, Gosset P, Wallaert B. Effect of intermittent inhaled tobramycin on sputum cytokine profiles in cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Jul;56(1):247-9.

## **10. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

Adriana Ester Bustamante nació en Argentina y se graduó como Médico cirujano en la Universidad Nacional de Córdoba en el año 1983, hizo la especialidad de Pediatría y luego la sub-especialidad de Neumología Pediátrica. Se ha dedicado casi exclusivamente a la evaluación, seguimiento y tratamiento de pacientes afectados con fibrosis quística.

En el año 2000 se radicó en Monterrey (México) y desde esa fecha y hasta la actualidad dirige la Clínica de fibrosis quística en el Centro de Prevención y Rehabilitación de Enfermedades Pulmonares Crónicas, perteneciente al Servicio de Neumología del Hospital Universitario “José Eleuterio González”-UANL.