

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL



Estudio del perfil oxidativo en células ciliadas del epitelio respiratorio nasal de pacientes con Síndrome de Discinesia Ciliar Primaria

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: IRENE GARCÍA ALÍA

TUTOR: FRANCISCO MARCO JIMÉNEZ

COTUTOR: FRANCISCO DASÍ FERNÁNDEZ

Curso académico: 2015 – 2016

VALENCIA, 23 de Mayo de 2016

Reserva de todos los derechos

Agradezco a mis tutores Francisco Marco y Francisco Dasí por aceptar mi petición de guiarme en este trabajo. A mis compañeros de laboratorio Sara, Silvia, Mer, Paquito y muy especialmente a Ana, por la paciencia y dedicación que han tenido conmigo desde el principio.

Y por supuesto a mi familia, por el apoyo y confianza que depositan siempre en mí y por ofrecerme la oportunidad de seguir aumentando mis conocimientos.

Estudio del perfil oxidativo en células ciliadas del epitelio respiratorio nasal de pacientes con Síndrome de Discinesia Ciliar Primaria

Resumen

La Discinesia Ciliar Primaria (DCP) es una enfermedad genética rara cuya prevalencia se estima en 1/20.000 nacimientos, caracterizada por un movimiento ciliar alterado o ausente que genera un déficit en el aclaramiento mucociliar, con la subsiguiente infección e inflamación crónica de las vías aéreas. Debido a la dificultad de diagnóstico, se planteó estudiar la relación entre la condición inflamatoria, característica de la enfermedad y un estado de estrés oxidativo celular. Se determinó el perfil oxidativo en células ciliadas del epitelio respiratorio nasal de 6 controles, 6 pacientes con DCP y 6 pacientes con manifestaciones clínicas compatibles, pero con tests diagnósticos negativos (*DCP-like*). Se midieron los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS), el glutatión (GSH) y el daño oxidativo en lípidos y proteínas. Además, el nivel de apoptosis y la función mitocondrial. Se determinó que el estrés oxidativo en la DCP depende de la producción de $\cdot\text{O}_2^-$ y H_2O_2 . El incremento en el $\Delta\Psi_m$ señala a este orgánulo como posible fuente de ROS. El alto nivel de GSH y la ausencia de daño en lípidos y proteínas reflejan un buen funcionamiento del sistema antioxidante. No se observan cambios significativos en los parámetros de apoptosis, NO, $\cdot\text{O}_2^-$ mitocondrial ni en la masa mitocondrial.

Palabras clave: Discinesia Ciliar Primaria, estrés oxidativo, especies reactivas del oxígeno, células ciliadas.

Abstract

Primary Ciliary Dyskinesia (PCD) is a rare genetic disorder with a prevalence estimated in 1/20.000 births which is characterized by an impairment or absence of ciliary beating, thus generating a lack of mucociliary clearance and subsequent infection and chronic inflammation of the airways. Because diagnosis remains a difficult task, it was proposed to study the existent relation between the characteristic inflammatory condition of these patients and the presence of a cellular oxidative stress state. Therefore, oxidative stress was determined in ciliated cells from nasal respiratory epithelium in 6 controls, 6 PCD patients and 6 patients showing same clinical phenotype although negative diagnostic (*PCD-like*). Levels of reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), glutathione (GSH) and oxidative damage in lipids and proteins were measured. In addition, apoptosis and the mitochondrial function were analyzed. $\Delta\Psi_m$ was enhanced in PCD patients, suggesting that this organelle is a source of ROS. High levels of GSH and absence of oxidative damage in lipids as well as proteins suggest that antioxidant capacity is enhanced in patients. No significant changes were determined neither in apoptosis, NO, mitochondrial $\cdot\text{O}_2^-$ or mitochondrial mass.

Keywords: Primary Ciliary Dyskinesia, oxidative stress, reactive oxygen species, ciliated cells.

Alumno: Dña. Irene García Alía

D. Francisco Marco Jiménez

D. Francisco Dasí Fernández

Valencia, 23 Mayo, 2016

ÍNDICE

1. Introducción

1.1. Estructura y función ciliar.....	1
1.2. La enfermedad: Discinesia Ciliar Primaria.....	1
1.2.1. Historia.....	2
1.2.2. Clínica.....	2
1.2.3. Genética.....	2
1.2.4. Diagnóstico.....	3
1.2.5. Tratamiento.....	4
1.3. Estrés oxidativo.....	4
1.3.1. Producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.....	4
1.3.2. Sistema de defensa antioxidante.....	5
1.3.3. Desbalance del sistema oxidante – antioxidante.....	6
1.3.4. Relación de estrés oxidativo y enfermedad.....	7

2.Objetivos.....	9
-------------------------	----------

3. Material y métodos

3.1. Aspectos éticos.....	10
3.2. Anamnesis y evaluación general.....	10
3.3. Población de estudio.....	10
3.4. Obtención de la muestra.....	11
3.5. Medición por citometría de flujo.....	11
3.6. Análisis estadístico.....	15

4. Resultados

4.1. Datos de la población de estudio.....	16
4.2. Confirmación del tipo celular.....	16
4.3. Marcadores de estrés oxidativo.....	17

5. Discusión.....	21
--------------------------	-----------

6. Conclusiones.....	25
-----------------------------	-----------

7. Bibliografía.....	26
-----------------------------	-----------

8. Anexos.....	30
-----------------------	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Introducción

Figura 1. Representación esquemática de la sección transversal de un cilio móvil.....	1
Figura 2. Alteraciones ultraestructurales ciliares en la DCP.....	3
Figura 3. Fuentes de producción de ROS y RNS en la célula.....	5
Figura 4. Formación de ROS y eliminación por mecanismos enzimáticos antioxidantes.....	6
Figura 5. Efectos biológicos del daño oxidativo causado por ROS.....	7

2. Materiales y métodos

Figura 6. Epitelio respiratorio pseudoestratificado.....	11
Figura 7. Elementos que componen un citómetro de flujo.....	12
Figura 8. Mecanismo de marcaje de células en apoptosis con anexina V y IP.....	13

3. Resultados y discusión

Figura 9. <i>Dotplots</i> de la población de células epiteliales totales y células epiteliales vivas marcadas con DAPI.....	16
Figura 10. <i>Dotplots</i> de la población de células ciliadas marcadas con el anticuerpo IgG1 CD151.....	17
Figura 11. Niveles del porcentaje de apoptosis y muerte celular.....	17
Figura 12. Niveles de fluorescencia en la producción de H ₂ O ₂ y ·O ₂ ⁻	18
Figura 13. Niveles de fluorescencia en la producción de NO y GSH.....	18
Figura 14. Niveles de fluorescencia en la medida del Lox/Lred y carbonilación proteica.....	19
Figura 15. Niveles de fluorescencia en los parámetros de la función mitocondrial.....	19

ÍNDICE DE TABLAS

1. Material y métodos

Tabla 1. Protocolo de marcaje fluorométrico para la medida de parámetros de estrés oxidativo en condiciones basales.....14

2. Resultados y discusión

Tabla 2. Características demográficas de la población de estudio.....16

ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
ADN	Ácido desoxirribonucléico
ATP	Adenosín trifosfato
CMF	Clorometilfluoresceína
DAF	Diaminofluoresceína
DAPI	2-(4-diaminofenil)-H-indol-6-carboxamida
DCF	Diclorofluoresceína
DCP	Discinesia Ciliar Primaria
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FSC	Forward Scatter
FTC	Fluoresceína 5-tiosemicarbazida
GPx	Glutación peroxidasa
GRx	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HE	Hidroetidina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
IP	Ioduro de Propidio
Lox/red	Ratio lípidos oxidados/lípidos reducidos
NO	Óxido nítrico
$\cdot O_2^-$	Anión superóxido
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SOD	Superóxido dismutasa
SSC	Side scatter
TMRM	Tetrametilrodamina

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estructura y función ciliar

Los cilios son orgánulos celulares que se han conservado evolutivamente y están presentes en muchos organismos unicelulares y en algunas células de organismos pluricelulares. Se clasifican en cilios primarios o sensoriales y cilios motores (Brown & Witman, 2014). Los primeros, inmóviles, son sensores de información y se encuentran en los órganos de la vista, oído, olfato y en las células epiteliales tubulares renales. Los segundos, se localizan en la superficie epitelial del tracto respiratorio, en la médula espinal, en las células ependimarias de los ventrículos cerebrales, y en los órganos reproductores masculino y femenino (conductos eferentes testiculares y trompas de Falopio, Ferkol *et al.*, 2006).

Se presentan como proyecciones de la célula rodeados por la membrana celular y tienen una función motora dirigida a la propulsión de partículas a través de un fluido o líquido sobre una superficie celular. La estructura fundamental es el axonema, que en cilios móviles presenta la organización "9+2" característica: un par central de microtúbulos internos, rodeados por 9 dobletes de microtúbulos periféricos. Estos últimos están unidos entre sí mediante puentes de nexina y al par central por brazos radiales. Asociados a los microtúbulos periféricos se encuentran los complejos de dineína, visualizados como brazos externos e internos de los dobletes (Fliegeauf *et al.*, 2007).

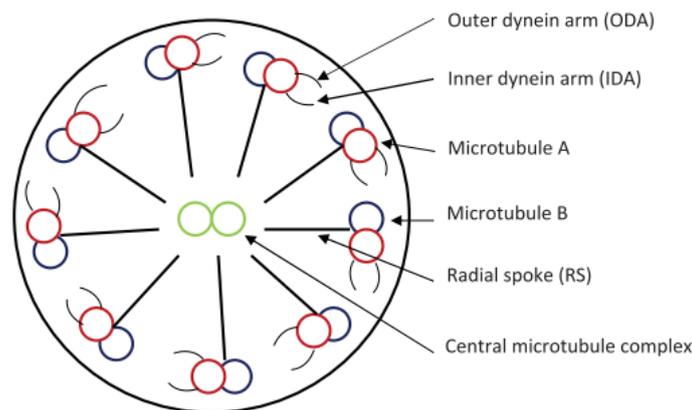


Figura 1. Representación esquemática de la sección transversal de un cilio móvil (Lobo *et al.*, 2015).

Los brazos de dineína están conectados con las ATPasas, que actúan como generadoras de movimiento mediante la hidrólisis del ATP (adenosín trifosfato). Así, la dineína está directamente relacionada con la función motora del cilio y son las espinas radiales las que determinan la dirección del movimiento (Popatia *et al.*, 2014).

1.2. La enfermedad: Discinesia ciliar Primaria

La Discinesia Ciliar Primaria (DCP) es una enfermedad genética rara que se caracteriza por una alteración en el patrón de motilidad de las estructuras ciliares y flagelares del organismo, lo cual genera un déficit en el correcto aclaramiento de las secreciones y detritus de la vía aérea superior e inferior (PCD FOUNDATION, 2002). Se trata de la segunda afección congénita más común de las vías respiratorias tras la fibrosis quística, con una prevalencia estimada en 1/20.000 nacimientos.

1.2.1. Historia

La primera caracterización clínica de la DCP se remonta a principios del siglo XX, primero Siewert (1904) y años más tarde Kartagener, que en 1933 describió la tríada de sinusitis, bronquiectasias y *situs inversus*, conocida más tarde con el nombre de Síndrome de Kartagener (Escudier *et al.*, 2009). A mediados de los años 70, Afzelius observó una alteración en la ultraestructura ciliar y un déficit de la movilidad ciliar en pacientes afectados con este síndrome, acuñando el término de “Síndrome del cilio inmóvil”. Posteriormente, se describieron casos en pacientes con esta condición que presentaban la misma clínica, pero cuyos cilios tenían un patrón de movimiento ineficiente. Fue entonces cuando esta entidad pasó a denominarse “Discinesia ciliar primaria” (Brown & Witman, 2014).

1.2.2. Clínica

Clínicamente las principales manifestaciones son las derivadas del estasis de secreciones mucosas e infecciones crónicas en las vías respiratorias altas y bajas debido a la ineficacia del transporte mucociliar en el tracto respiratorio. Durante la infancia, la enfermedad se expresa con tos y broncorrea crónica, rinosinusitis crónica, agenesia de los senos frontales y otitis recurrente (Noone *et al.*, 2004). La infección bronquial se inicia precozmente y es la mayor causa de morbilidad y mortalidad en la DCP. Las bacterias más comunes en niños y adolescentes son *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Hosie *et al.*, 2014). En la edad adulta se observan complicaciones como asma, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) y presencia de bronquiectasias. Estas últimas pese a que pueden presentarse en la infancia, es en el adulto cuando se hacen constantes y marcan el pronóstico de la enfermedad (Armengot *et al.*, 2010).

El trastorno de movilidad afecta también al espermatozoide y a los cilios de la trompa de Falopio, por lo que es común la esterilidad en los varones y una fertilidad reducida en las mujeres, con mayor riesgo de embarazo ectópico. Además, la ineficacia de los cilios nodales embrionarios hace que la simetría de los órganos internos se disponga al azar, dando lugar, en aproximadamente un 50% de estos pacientes, a *situs inversus*, condición que junto con la DCP se conoce como síndrome de Kartagener (Boon *et al.*, 2013).

1.2.3. Genética

La herencia de la DCP es en la mayoría de los casos autosómica recesiva, sin predilección por el sexo. No obstante, se han descrito casos de transmisión ligada al cromosoma X, así como herencia autosómica dominante (Leigh *et al.*, 2009). Genéticamente, se trata de una enfermedad muy heterogénea (Bush *et al.*, 2007), pues existe un amplio número de mutaciones que pueden originarse en los genes codificantes de las más de 250 proteínas implicadas en la conformación de la estructura del cilio, ensamblaje y regulación del movimiento ciliar. Hasta la fecha, se han identificado 32 mutaciones relacionadas con la enfermedad (Kim *et al.*, 2014). De ellas, las más ampliamente estudiadas se encuentran en los genes DNAH5 (cromosoma 5p15.2) y DNAI1 (cromosoma 9p13.3), que codifican para los brazos externos de la dineína y se han detectado en un 25% de los pacientes con DCP (Lobo *et al.*, 2015).

1.2.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad, se basa en la suma de las características clínicas descritas, además del análisis de la estructura y función ciliar, puesto que puede haber estructura normal con función alterada. Sin embargo, la heterogeneidad del cuadro clínico dificulta y retrasa el diagnóstico, pudiéndose confundir con otras enfermedades respiratorias crónicas. Por ello, el estudio de un paciente con sospecha de DCP debe incluir la exclusión de otros diagnósticos diferenciales, como fibrosis quística e inmunodeficiencias (Strippoli *et al.*, 2012).

Inicialmente, los pacientes son sometidos a distintos test de cribado. La prueba más extensamente utilizada en clínica es el test de NO nasal exhalado, parámetro que ha demostrado encontrarse disminuido en la mayoría de pacientes con DCP (Marthin *et al.*, 2011). Asimismo, se realiza un análisis de la función ciliar a partir de una muestra de células ciliadas del epitelio nasal, empleando un microscopio óptico acoplado a una cámara de vídeo digital de alta resolución que permite detectar cualquier alteración ciliar mediante el estudio de la frecuencia de batido y su patrón de movimiento (Armengot *et al.*, 2012). Por último, se estudia la ultraestructura ciliar con microscopía electrónica, ya que la presencia de modificaciones está ligada a defectos en la función (Chilvers *et al.*, 2003). Los defectos ciliares más frecuentes son los déficits de dineína, pudiendo deberse a una ausencia total (15% de los casos), asociada a inmovilidad, o únicamente de los brazos externos (40% de los casos), asociada a discinesia (Knowles *et al.*, 2013). Otras alteraciones menos prevalentes incluyen ausencia de los brazos radiales, agenesia de los microtúbulos centrales y transposición ciliar (Ferkol *et al.*, 2006).

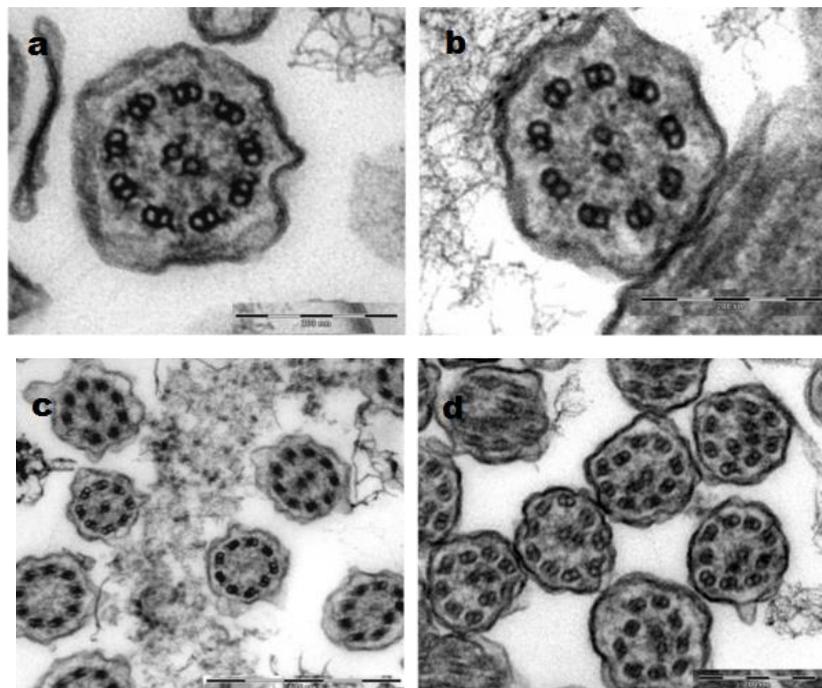


Figura 2. Alteraciones ultraestructurales más frecuentes en la discinesia ciliar primaria, observadas al microscopio electrónico: a) cilio normal; b) déficit de brazos externos e internos de dineína; c) ausencia de microtúbulos centrales; d) desorganización tubular (Lucas *et al.*, 2015).

1.2.5. Tratamiento

Actualmente, no se dispone de ningún tratamiento farmacológico que permita recuperar la normalidad del batido ciliar. No obstante, ciertas medidas terapéuticas contribuyen a mejorar la evolución de la enfermedad, así como disminuir su morbilidad. Se basan en la monitorización periódica del estado general, controlando la función respiratoria y auditiva, el drenaje de las secreciones mediante fisioterapia y ejercicio físico y el empleo de antibióticos para el tratamiento de las infecciones de las vías aéreas (Armengot *et al.*, 2010).

1.3. Estrés oxidativo

1.3.1. Producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno

Como consecuencia del metabolismo aerobio celular y la exposición a determinados agentes externos como las radiaciones ionizantes, la luz ultravioleta o el humo del tabaco, se generan en las células especies reactivas del oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) (Domej *et al.*, 2014). Las ROS son compuestos derivados de la molécula de oxígeno (O₂) por reducción química parcial, e incluye tanto a los radicales libres, moléculas reactivas caracterizadas por tener un electrón desapareado en su capa más externa, como a especies no radicales derivadas de estos últimos.

La primera especie reactiva de oxígeno generada en los sistemas biológicos es el anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), que debe su inestabilidad a la reacción de dismutación del $\cdot\text{O}_2^-$ a peróxido de hidrógeno (H₂O₂), altamente favorable. El H₂O₂ a diferencia del anterior, no es un radical libre y por ello es más estable. Sin embargo, en presencia de metales de transición puede dar lugar al radical hidroxilo (OH \cdot), molécula extremadamente reactiva y tóxica que puede reaccionar con ácidos grasos poliinsaturados produciendo los radicales alcoxil (RO \cdot) y peroxil (ROO \cdot) (Weidinger & Kozlov, 2015). A su vez, la interacción de diversos ROS con derivados del nitrógeno puede resultar en la generación de especies reactivas de nitrógeno (RNS, *Reactive Nitrogen Species*), entre las que se encuentra el óxido nítrico (NO) el dióxido de nitrógeno (NO₂) y el peroxinitrito (ONOO \cdot) (Le Bras *et al.*, 2005).

En los organismos superiores, la producción de ROS y RNS puede tener origen en cualquier compartimento celular, si bien, la fuente endógena de especies reactivas más importante es la mitocondria. Este orgánulo es el principal responsable del aporte energético a la célula a través de la fosforilación oxidativa. En este proceso, la energía de oxidación derivada durante la reducción del O₂ en la cadena de transporte de electrones, genera un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$: potencial de membrana mitocondrial) que permite la síntesis de ATP. Sin embargo, cuando este potencial es elevado, se produce un enlentecimiento del flujo electrónico a través de la cadena respiratoria, favoreciendo la reducción parcial del oxígeno con la consiguiente formación de ROS (Figueira *et al.*, 2013).

Asimismo, cualquier sistema enzimático con capacidad oxidativa puede generar ROS como subproductos de la reacción de transferencia electrónica. Éste es el caso del citocromo p450 (en el retículo endoplasmático), la xantina oxidasa (en los peroxisomas) o la NADPH oxidasa (en las membranas plasmáticas de los leucocitos), entre otras (Weidinger & Kozlov, 2015).

Endogenous sources of ROS and RNS

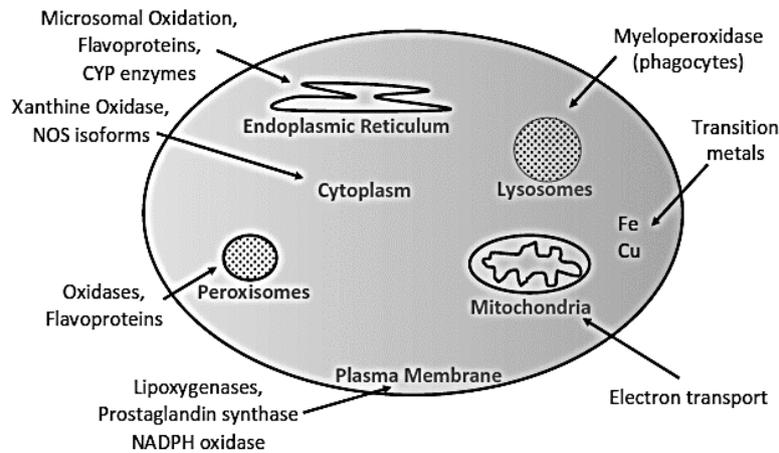


Figura 3. Fuentes de producción de ROS y RNS en la célula (Figueira et al., 2013).

1.3.2. Sistema de defensa antioxidante

Las ROS desempeñan un papel fisiológicamente importante en el organismo, pues son necesarias para la producción de energía, la síntesis de compuestos biológicamente esenciales y la fagocitosis. Además, juegan un papel vital en la transducción de señales, de gran importancia para la comunicación y función de las células. No obstante, una producción incontrolada de ROS puede convertirse en fuente de enfermedad, dado que estas especies dañan las estructuras de las macromoléculas (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) para estabilizarse, causando alteraciones en los procesos celulares que regulan su fisiología y metabolismo (Alfadda & Sallam, 2012).

Con objeto de prevenir los efectos lesivos de la producción *in vivo* de ROS y RNS, la evolución ha dotado a los organismos superiores de un sistema de defensa antioxidante complejo y eficaz. Este sistema está constituido por un grupo de sustancias que, al estar presentes en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este, actuando así como eliminadoras (*scavengers*) y reparadoras del daño producido (Elejalde, 2001). Entre estos se incluyen sistemas enzimáticos antioxidantes capaces de metabolizar los ROS, como la superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la dismutación de $\cdot\text{O}_2^-$ a H_2O_2 , la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) que catalizan el metabolismo de H_2O_2 a $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. De ellos, el sistema del glutatión constituye uno de los mecanismos de defensa antioxidante intracelular más importantes. En el proceso de detoxificación del H_2O_2 , la GPx consume por oxidación el glutatión reducido (GSH), principal molécula antioxidante soluble y este queda en su forma oxidada (GSSG). Así, es la glutatión reductasa (GRx) la encargada de regenerar el tripéptido en su forma reducida, empleando el coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) como dador de electrones (Pamplona & Costantini, 2011).

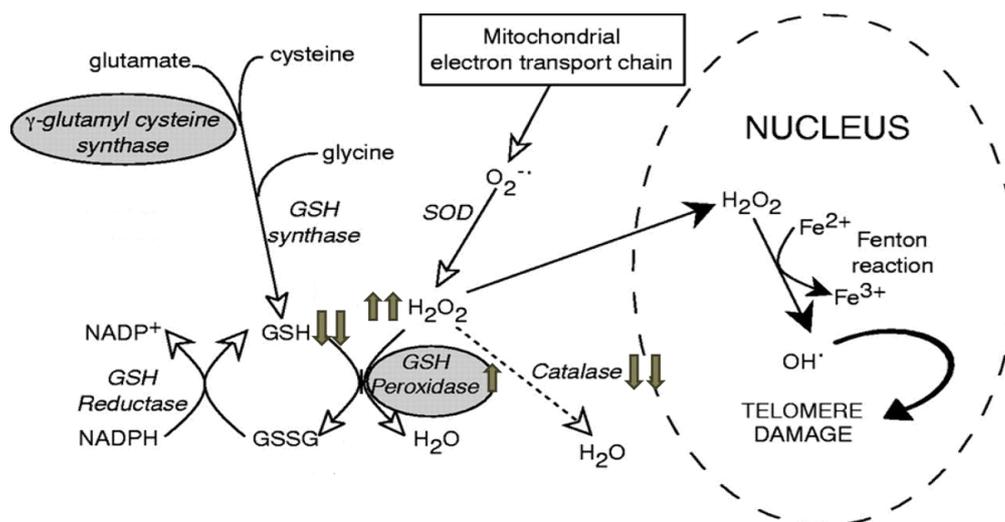


Figura 4. Formación de ROS y eliminación por mecanismos enzimáticos antioxidantes (Kurz, *et al.*, 2004).

A su vez, conforman la defensa antioxidantes no enzimáticos, entre los que se encuentra un extenso conjunto de moléculas producidas de forma endógena, como el GSH, la coenzima Q10 o proteínas como la transferrina y la ceruloplasmina, y moléculas exógenas, suministradas en la dieta, como la vitamina E, vitamina C, cofactores (Se, Zn, Mn) y compuestos naturales como carotenoides y flavonoides (Gupta *et al.*, 2014).

1.3.3. Desbalance del sistema oxidante – antioxidante

En el cuerpo humano, es necesario preservar un balance constante entre la producción de factores pro-oxidantes y los sistemas de defensa antioxidantes. No obstante, cuando se produce una ruptura del equilibrio a favor de los primeros, bien debido a un incremento de los niveles de radicales y especies reactivas o, por el contrario, a un déficit de las defensas antioxidantes, se produce un estado de estrés oxidativo (Le Bras *et al.*, 2005).

Éste induce en la célula efectos tóxicos resultantes del daño a las macromoléculas (Alfadda & Sallam, 2012). La peroxidación lipídica por los radicales libres resulta en una reacción en cadena en la que la oxidación de un ácido graso desencadena una serie de reacciones oxidativas, que traen consigo el daño a estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados y con ello la alteración de la permeabilidad de la membrana celular. Por su parte, las proteínas expuestas a ROS pueden sufrir dos tipos de modificaciones químicas. Son, en la mayoría de los casos, de tipo irreversible y están asociadas con la pérdida permanente de la función, como son la carbonilación (formación de aldehídos y cetonas), la nitración, la formación de enlaces proteína-proteína o la ruptura de enlaces peptídicos. Las segundas, reversibles, se producen normalmente en cisteínas, y pueden activar una función proteica o proteger al residuo de la oxidación (Díaz-Acosta & Membrillo-Hernández, 2006). De manera similar, la acción oxidativa sobre el ADN conlleva fenómenos de mutagénesis que ponen en compromiso su estructura y que de no ser reparado a tiempo puede transmitirse a las células hijas.

Todo ello provoca una alteración de la homeostasis que ha de ser restaurada. La degradación de los lípidos y las proteínas oxidadas se produce mediante los mecanismos de recambio celular normales, y de igual forma, el ADN dañado ha de ser reparado. Así, la célula actúa reparando

dichas lesiones, activando diversos puntos de control del ciclo celular y en última instancia induciendo mecanismos de muerte celular, como la necrosis y la apoptosis.

En el proceso de necrosis hay un desencadenante tóxico o patológico, que afecta a la viabilidad de numerosas células vecinas. Además, se produce rotura de la membrana plasmática, con la consiguiente liberación de material citoplasmático y escape al exterior de elementos tóxicos que contribuyen a la aparición de procesos inflamatorios. Por su parte, el mecanismo apoptótico es programado y únicamente afecta a determinadas células. Conlleva compactación de la cromatina, fragmentación del ADN y formación de cuerpos apoptóticos por condensación del citoplasma. Sin embargo, en este caso no hay pérdida de integridad de la membrana, salvo un cambio en la simetría, que lleva a las células a exponer en la superficie algunos fosfolípidos como la fosfatidil serina que favorecen la digestión de los cuerpos apoptóticos por fagocitosis, sin desencadenar una respuesta inflamatoria (Zhang *et al.*, 1997).

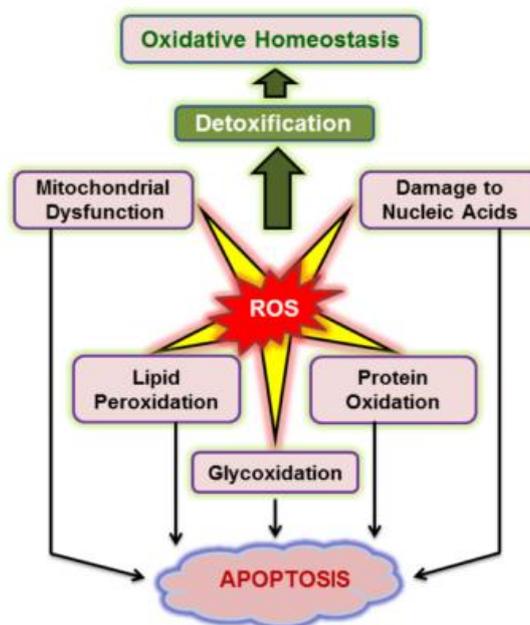


Figura 5. Efectos biológicos del daño oxidativo causado por ROS (Behera *et al.*, 2014).

1.3.4. Relación de estrés oxidativo y enfermedad

La inflamación es una respuesta del organismo ante la exposición a agentes infecciosos o estímulos antigénicos. En el proceso inflamatorio, las células fagocíticas como los neutrófilos y los macrófagos, y las no fagocíticas como los linfocitos, producen grandes cantidades de ROS y RNS para señalar y eliminar dichos agentes (Biswas, 2016). No obstante, si el proceso inflamatorio es ineficiente y se hace crónico, se transforma en un proceso fisiopatológico que conlleva una producción desproporcionada de especies reactivas y, por consiguiente, estrés oxidativo, que puede derivar en un incremento del riesgo a desarrollar enfermedades crónicas. De hecho, el estrés oxidativo induce la activación de factores de transcripción que producen mediadores de la inflamación, lo que supone un agravamiento de la respuesta inflamatoria (Lee *et al.*, 2015).

En estudios previos, se ha revelado la estrecha relación de ambos procesos fisiopatológicos por presentarse de manera conjunta en múltiples enfermedades, que incluyen pero no se limitan a la aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer), enfermedades

cardiovasculares, diabetes, cáncer y envejecimiento (Elejalde, 2001). Esto pone de manifiesto la necesidad de describir las características fisiológicas celulares que puedan incidir en la expresión clínica de las patologías.

En el caso de la presente enfermedad, el estudio de la inflamación e infección de las vías respiratorias en pacientes con DCP ha permitido determinar mecanismos de daño tisular, midiendo neutrófilos leucotrienos (LT) B4 e interleucina (IL) -8, así como el marcador de estrés oxidativo 8-isoprostano, demostrándose que el estrés oxidativo, se haya incrementado en el condensado de aire exhalado de niños enfermos (Zihlif *et al.*, 2006); sin embargo, nunca se ha determinado en el tejido propiamente afectado.

Se plantea de esta manera la necesidad de evaluar el perfil oxidativo de las células que componen el epitelio respiratorio, a fin de descifrar su papel en el proceso inflamatorio característico de la enfermedad. Además, la dificultad que presenta el diagnóstico de la enfermedad es determinante para muchos pacientes, que aún permanecen sin diagnosticar, lo que hace necesario plantear si el estrés oxidativo puede contribuir como herramienta en la detección de este proceso.

Para ello es preciso determinar las especies reactivas que se generan en dichas células, así como evaluar su función mitocondrial como posible fuente de producción. Debido a la elevada reactividad y la relativa inestabilidad de los ROS y RNS, su detección en los sistemas biológicos resulta costosa (Domej *et al*, 2014). Por ello, la determinación de estas moléculas se realiza a menudo de forma indirecta, valorando la generación de productos finales de la reacción de los ROS/RNS con componentes celulares, que servirán como marcadores del grado de oxidación. Entre estos se encuentran los productos de la peroxidación lipídica, los grupos carbonilo de la oxidación de las proteínas y la base modificada 8-oxo-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) como producto de la oxidación del material genético.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal es determinar mediante citometría de flujo el perfil oxidativo en condiciones basales de las células ciliadas del epitelio respiratorio nasal de pacientes con síndrome de Discinesia Ciliar Primaria.

Por otro lado también se comparará el perfil oxidativo en (i) un grupo de voluntarios sanos, (ii) un grupo de pacientes con Discinesia Ciliar Primaria y (iii) un grupo de pacientes con sospecha clínica de la enfermedad, pero con diagnóstico negativo para la patología (*DCP-like*), todos ellos ajustados por edad y sexo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo gracias a la colaboración de la Unidad de Neumología infantil y Fibrosis Quística del Servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV), el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital General Universitario de Valencia (HGUV) y el laboratorio de Fisiología de la UCIM (Unidad Central de Investigación de Medicina) en el Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA.

3.1. Aspectos éticos

El proyecto fue aprobado por los Comités Éticos de Investigación del HCUV y del HGUV, que establecieron su conformidad ante el estudio alegando el cumplimiento de información a los pacientes, así como la confidencialidad de las muestras y bases de datos, de acuerdo a los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la Declaración de Helsinki de la Asamblea Médica Mundial (Anexos I y II). Los participantes, tanto mayores como menores de edad, en este caso acompañados de sus padres/tutores, fueron correctamente informados acerca del estudio y su voluntad de participación se aceptó formalmente con la firma del consentimiento informado, hoja en la que se detallan los objetivos del estudio, así como las condiciones que derivan de su participación (Anexo III).

3.2. Anamnesis y evaluación general

Los médicos se encargaron de recoger la firma del consentimiento informado de cada uno de los participantes del estudio, así como la historia clínica y datos exploratorios. El médico otorrinolaringólogo realizó la obtención de las biopsias de los pacientes y los controles, que posteriormente fueron recogidas y trasladadas hasta el laboratorio donde tuvo lugar el desarrollo del proyecto.

3.3. Población de estudio

Para el estudio se seleccionaron un total de 18 participantes del Servicio de Pediatría del HCUV y del Servicio de Otorrinolaringología del HGUV, que se distribuyeron en tres grupos de 6 atendiendo a los criterios de inclusión y exclusión que se describen a continuación.

Criterios de inclusión:

1. Voluntarios sanos: Sin clínica respiratoria bronquial, enfermedad local o sistémica, alergias ni rinosinusitis; no fumadores.
2. Pacientes con DCP: Signos y síntomas propios de la enfermedad, clínica desarrollada caracterizada por tos productiva crónica, rinorrea crónica, con o sin distrés neonatal, "*situs inversus*" o bronquiectasias. Con diagnóstico confirmado.
3. Pacientes DCP-like: Con sospecha clínica de DCP pero con pruebas diagnósticas negativas específicas para la enfermedad (función ciliar normal).

Criterios de exclusión:

Estos se extienden a los tres grupos mencionados anteriormente e incluyen: presentar o haber presentado en los 3 meses previos artritis reumatoide, lupus eritematoso, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes mellitus y neoplasias, o cualquier tipo de cirugía; haber

realizado ejercicio físico intenso en los 4 días anteriores a la toma de la muestra o haber consumido terapias antioxidantes en los 3 meses previos a dicha toma.

3.4. Obtención de células del epitelio nasal humano

La toma de muestra de células del epitelio respiratorio se realizó ambulatoriamente, mediante un curetaje nasal, un raspado suave efectuado en el cornete nasal medio, puesto que es un área de fácil acceso en el que existe una alta densidad de células ciliadas. Se trata de una técnica mínimamente invasiva, indolora, rápida y sin riesgo de efectos secundarios, que puede efectuarse sin necesidad de aplicar anestesia local y además ofrece a posibilidad de repetir la extracción tantas veces como se desee (Bukowy *et al.*, 2011).

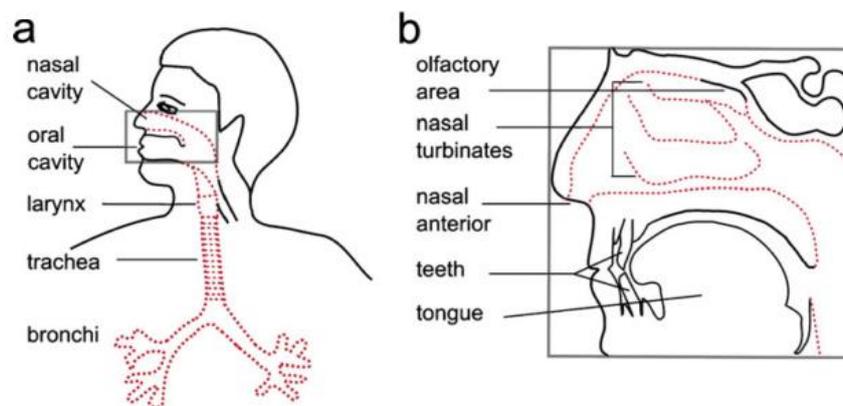


Figura 6. Epitelio respiratorio pseudoestratificado: a) localización en las vías respiratorias; b) localización en la cavidad nasal (Bukowy *et al.*, 2011).

3.5. Medidas por citometría de Flujo

La citometría de flujo es un método de análisis celular multiparamétrico que permite la medición de ciertas características físicas y químicas de las células o partículas suspendidas en un fluido, que producen una señal de forma individual al interferir con un rayo de luz. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a distintos parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores.

El principio de esta tecnología conocida como *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)* se basa en el paso de las células en suspensión, de manera alineada e individualizada, por un haz luminoso que provoca que cada célula, a la vez que dispersa la luz, emita fluorescencia como resultado de la excitación con láser a la que es sometida. Así, la información puede agruparse en:

1. *Forward scatter (FSC)*, señal resultante de la dispersión frontal de la luz y cuya magnitud es aproximadamente proporcional al tamaño celular.
2. *Side scatter (SSC)*, señal procedente de la dispersión lateral que es proporcional a la cantidad de estructuras granulares o a la complejidad de la célula.

3. Intensidad de fluorescencia, resultante del marcaje específico de las células con fluorocromos que son excitados hasta emitir a una longitud de onda mayor que la de la fuente de luz.

Esta combinación de luz dispersada y fluorescencia es recogida por los detectores, que se encargan de transformar las señales luminosas en impulsos eléctricos, que se amplifican y posteriormente son digitalizadas para su procesamiento e interpretación con un *software* de análisis.

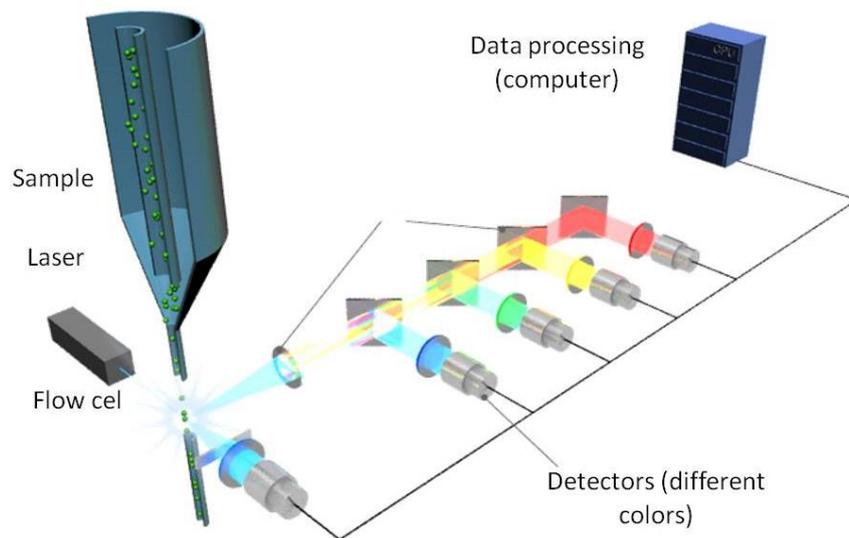


Figura 7. Representación esquemática de los elementos que componen un citómetro de flujo (Fuente: www.biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=1104a_tecnica_citometra; visto el 10 de marzo de 2016).

Todos los ensayos de citometría se realizaron en el citómetro de flujo FACSVerse (*BD Biosciences*), excepto el ratio Lípidos oxidados/Lípidos reducidos (Lox/Lred), que se llevó a cabo en el citómetro FACSAria III de BD. Los programas utilizados para la adquisición de datos fueron el BD FACSSuite, en el caso del primer citómetro, y BD FACSDiva 4.0 para el citómetro FACSAria III. El programa utilizado para el análisis de los datos fue el FLOWJO Version 10.1, en el que los resultados se expresan como unidades de fluorescencia.

3.5.1. Pretratamiento de la muestra

La biopsia se transportó en tubo eppendorf con 1 mL de medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) en hielo (4°C). Pevio a la medida en el citómetro fue necesario el tratamiento de la muestra. Primero se centrifugó a 400xg, 4°C durante 5 minutos. Tras ello se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de *Bronchial Epithelial Cell Growth Medium* (BEGM) (*Lonza*) y 10 µL de 100x DNasa1 y se incubó la muestra 20 minutos a temperatura ambiente con objeto de favorecer la disgregación de las células. Por último, se centrifugó nuevamente a 400xg, 4°C, 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 600 µL del medio RPMI 1640 de *Gibco* (*Grand Island, NY, USA*). Toda la metodología empleada se basa en el trabajo de Müller *et al.* (2013).

3.5.2. Análisis citométrico de la muestra

Inicialmente se filtró la muestra con un filtro estéril para eliminar la presencia de agregados celulares que pudieran impedir el paso de fluido en el citómetro y se realizó el conteaje de las células existentes en la muestra.

a) Identificación de la población con anticuerpo

Se realizó la identificación del tipo celular de interés, pues este tejido está formado por tres tipos de células: células basales o células madre del epitelio, células caliciformes o secretoras de moco y células ciliadas. Para la identificación de la población de células ciliadas en la muestra se siguió el protocolo de Hajj *et al.* (2007) y se efectuó una tinción fluorimétrica con el anticuerpo monoclonal IgG1 CD151 (concentración stock 0,75 mg/mL) (Alexa Fluor® 647, *Novus Biologicals*), específico de la proteína transmembrana tetraspanina CD151 presente en células basales.

b) Medida de muerte celular

Se analizó el nivel de muerte celular con el Kit de detección de apoptosis *Annexin V* de *Immunostep*. La anexina V es una molécula incapaz de difundir a través de la membrana, que además muestra gran afinidad por la fosfatidil serina. Así, las células marcadas con anexina V son las que se encuentran en apoptosis. Además, acompañada de una tinción con Yoduro de Propidio (IP), es posible evaluar el estado de integridad de la membrana, lo que permite distinguir si la célula se encuentra en una etapa temprana de muerte celular, o por el contrario, una etapa tardía con presencia de necrosis. De esta manera, el marcaje de las células con ambos fluorocromos permitió distinguir en la muestra las células vivas (negativas para ambos), en apoptosis temprana (positivas para anexina V y negativas para IP) y muertas (positivas para ambos) (Zhang *et al.*, 1997).

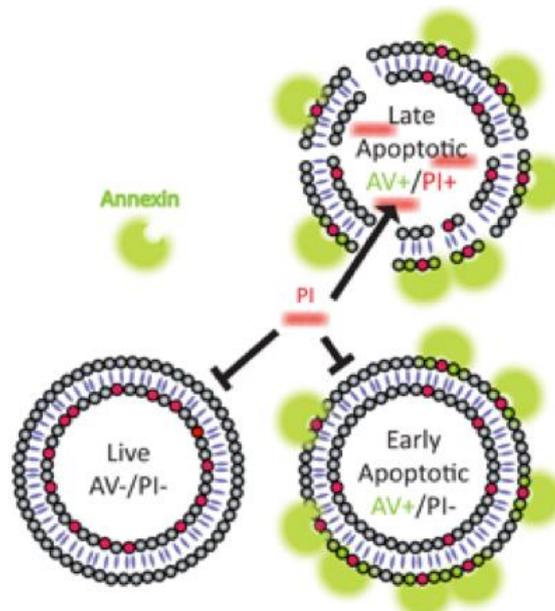


Figura 8. Mecanismo biológico del marcaje de células en apoptosis con anexina V e IP (Fuente: <http://stmichaelshospitalresearch.ca/staff-services/research-facilities/facilities/flow-cytometry-core/cell-viability-apoptosis/>; visto el 20 de febrero de 2016).

Se calculó un volumen de muestra correspondiente a 12.000 células y se completó hasta 100 μL con medio RPMI 1640. A la muestra se añadieron: 100 μL de tampón *Annexin V Binding Buffer* (pH 7,4) diluido 1:10 con PBS, 5 μL de *Annexin V* y 5 μL de IP. Las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Tras el periodo de incubación se agregaron de nuevo 300 μL de la solución tampón 1:10.

c) Medida de parámetros de estrés oxidativo en condiciones basales

Se realizaron las medidas correspondientes a diferentes parámetros de estrés oxidativo y se dividió la muestra en siete alícuotas. Se calculó el volumen de muestra necesario para disponer 8.000 células por tubo y se completó hasta un volumen final de 250 μL con medio RPMI 1640.

Tabla 1. Protocolo de marcaje fluorométrico para la medida de parámetros de estrés oxidativo en condiciones basales.

Tubo	Parámetro	Fluorocromo	Canal de medida
1	Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$)	TMRM 0.63 μL [240.00 μM]	PE
	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	DCF 0.63 μL [1.00 mg/mL]	FITC
2	Anión superóxido total ($\cdot\text{O}_2^-$ total)	HE 0.63 μL [1.00 mg/mL]	7AAD
	Glutatión reducido (GSH)	CMF 0.63 μL [10.00 μM]	FITC
3	Óxido nítrico (NO)	DAF 0.20 μL [1.25 mM]	FITC
4	Anión superóxido mitocondrial ($\cdot\text{O}_2^-$ mitocondrial)	MitoSOX 0.32 μL [0.50 mM]	7AAD
5	Masa mitocondrial	Mitotracker Green 1.95 μL [1.00 mM]	FITC
6	Proteínas carboniladas	FTC 0.20 μL [1.00 mM]	FITC
7	Lox/Lred	BODIPY 0.20 μL [1.00 mM]	PE/APC

El ensayo para la detección del $\Delta\Psi\text{m}$ se analizó utilizando tetrametilrodamina (TMRM) de *Molecular Probes de Life Technologies (Eugene, Oregon, USA)*, una sonda fluorescente que se acumula en el interior de las mitocondrias funcionales que presentan un potencial de membrana intacto. Así la señal de fluorescencia es directamente proporcional a la funcionalidad mitocondrial (Scaduto & Grotyohann, 1999). La oxidación de la 2'-7'-diclorofluoresceína (DCFH) de *Molecular Probes de Life Technologies (Eugene, Oregon, USA)* al compuesto fluorescente verde 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF) por la presencia de H_2O_2 permite utilizar esta reacción como indicador específico de la formación de esta especie reactiva. El $\cdot\text{O}_2^-$ total se evaluó con hidroetidina (HE) de *Molecular Probes de Life Technologies (Eugene, Oregon, USA)*, compuesto fluorogénico que se oxida por el ión superóxido convirtiéndose en etidio y emite fluorescencia en rojo (Kalyanaraman *et al.*, 2012). El GSH se midió con clorometilfluoresceína (CMF) de

Molecular Probes de Life Technologies (Eugene, Oregon, USA), indicador fluorescente del estado reducido de los tioles intracelulares. El nivel de NO se analizó mediante la sonda diaminofluoresceína (DAF) de *Molecular Probes de Life Technologies (Eugene, Oregon, USA)*, compuesto no fluorescente que tras la reacción con NO forma un compuesto fluorescente, el benzotriazol. La detección de $\cdot\text{O}_2^-$ mitocondrial se realizó con *MitoSOX de Molecular Probes de Life Technologies (Eugene, Oregon, USA)*, colorante fluorogénico que se dirige específicamente a las mitocondrias de células vivas y se oxida rápidamente por superóxidos, y no por otros sistemas de generación de ROS, emitiendo fluorescencia en rojo tras unirse con los ácidos nucleicos (Mukhopadhyay *et al.*, 2007). La masa mitocondrial se midió con *Mitotracker Green de Molecular Probes de Life Technologies (Eugene, Oregon, USA)*, una molécula fluorescente, que se acumula selectivamente en la mitocondria por unión covalente a proteínas con grupos tiol libres, emitiendo fluorescencia en verde. Los niveles de oxidación proteica se midieron usando fluoresceína 5-tiosemicarbazida (FTC) de *Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)*, una molécula que emite fluorescencia verde en presencia de grupos carbonilo de las proteínas. Por último, para calcular el nivel de peroxidación lipídica, se empleó el marcador fluorescente BODIPY de *Molecular Probes de Life Technologies (Eugene, Oregon, USA)*, caracterizado por cambiar de la emisión en rojo a la emisión en verde en presencia de oxidación, que permite determinar el ratio Lox/Lred.

Tras el marcaje con los fluorocromos, las muestras 1, 2, 3, 4, 5 y 6, se incubaron 20 minutos a 37°C. Cinco minutos antes de terminar el periodo de incubación se añadió a cada tubo 0,20 μL de 2-(4-diaminofenil)-H-indol-6-carboxamida (DAPI) (concentración *stock* de 1,00 mg/mL), un marcador nuclear que se emplea para seleccionar la población de células vivas en la muestra. La muestra correspondiente al tubo 7 se incubó durante 30 minutos a 37°C.

3.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el *software* GraphPad Prism (versión 6.01). Se verificó la normalidad de los datos con el test de Shapiro-Wilk. La comparación de las medias entre los grupos de variables se realizó mediante el test paramétrico ANOVA (análisis de la varianza) y la comparación entre parejas de grupos se evaluó con el test de Tukey. En los grupos que no presentaron normalidad estadística, la comparación de las medianas se efectuó con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (KW), y para identificar la diferencia entre cada pareja de estudio se realizó el test de comparaciones múltiples de Dunn. Se consideró un p-valor menor a 0,05 significativo estadísticamente. Los datos de las figuras se presentan como media y error estándar (SEM).

4. RESULTADOS

4.1. Datos de la población de estudio

En el estudio participaron un total de 18 personas, distribuidas en los tres grupos establecidos: 6 controles sanos, 6 pacientes DCP-*like* y 6 pacientes con DCP. Los datos correspondientes a la edad y el sexo de los sujetos de estudio quedan reflejados en la Tabla 2.

Tabla 2. Representación de las características demográficas de la población de estudio, expresadas como media \pm SEM y el p-valor de la comparación entre grupos.

	Control	DCP- <i>like</i>	DCP	p-valor
N	6	6	6	
Edad	12,7 \pm 2,06	8,0 \pm 1,81	14,6 \pm 2,45	0,7455
Sexo M/F	3/3	3/3	4/2	>0,9999

N: número de muestras. M: Sexo Masculino; F: Sexo Femenino; DCP-*like*: pacientes con manifestaciones clínicas y diagnóstico negativo para la Discinesia Ciliar Primaria; DCP: pacientes con diagnóstico positivo para Discinesia Ciliar Primaria.

4.2. Confirmación del tipo celular

El análisis citométrico se realizó con el software FLOWJO Version 10.1. Los resultados muestran la población total de células epiteliales según tamaño y morfología y la población de células vivas (DAPI⁻) de la muestra marcada con DAPI (Figura 9). El marcaje con el anticuerpo IgG1 CD151 distingue las poblaciones de células ciliadas (CD151⁻) y basales (CD151⁺) (Figura 10).

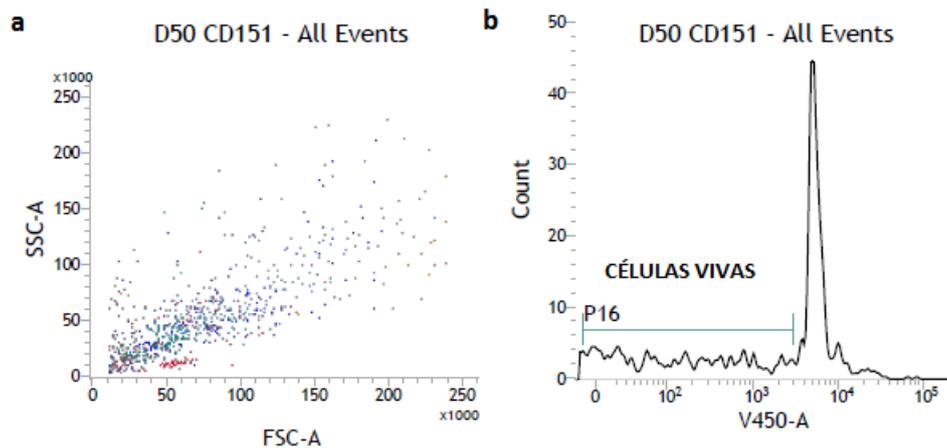


Figura 9. Identificación de la población de células epiteliales totales (a) representadas según tamaño y morfología (FSC-A vs SSC-A) y selección de la población de células epiteliales vivas (DAPI⁻) (b) tras el marcaje de la muestra con DAPI.

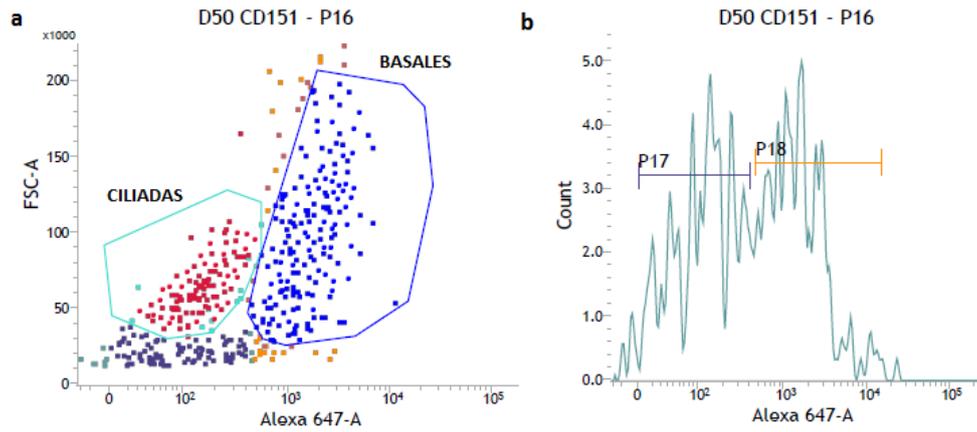


Figura 10. *Sorting* de la población de células epiteliales nasales vivas: a) el marcaje de la población con el anticuerpo IgG1 CD151 separa las células ciliadas (CD151⁻) y las células basales (CD151⁺) en el canal Alexa 647- A; b) selección de la población de células ciliadas (P17) y células basales (P18).

4.3. Marcadores de estrés oxidativo

a) Apoptosis y muerte celular

El nivel de muerte celular (Figura 11b) no muestra diferencias significativas entre los grupos de estudio, salvo una disminución en el porcentaje de células apoptóticas en el grupo de pacientes con DCP respecto al resto de grupos, sin que esta diferencia alcance significación estadística ($p=0,3896$).

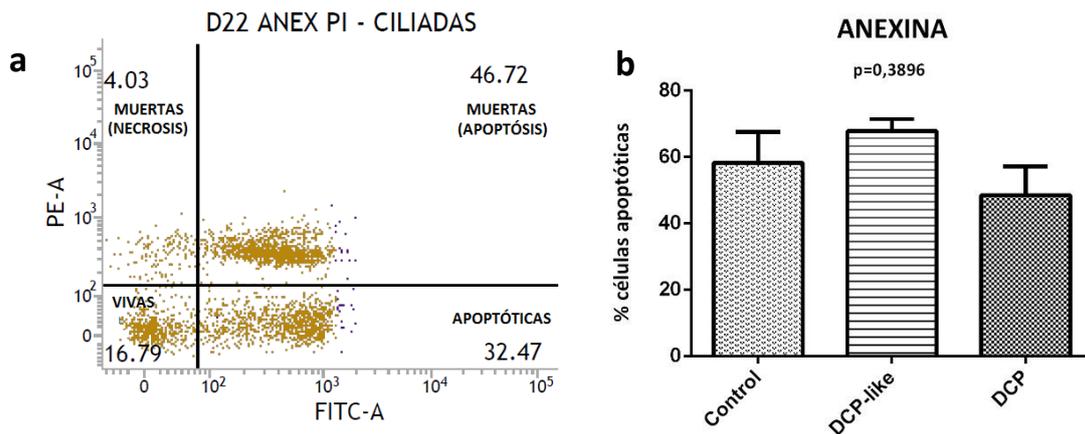


Figura 11. a) Poblaciones de células vivas (PE⁻/FITC⁻), células apoptóticas (PE⁻/FITC⁺), células muertas por apoptosis (PE⁺/FITC⁺) y células muertas por necrosis u otros mecanismos (PE⁺/FITC⁻) tras el marcaje de la muestra con anexina V (FITC-A) y PI (PE-A); b) Niveles del porcentaje de células apoptóticas en los diferentes grupos analizados: controles, pacientes DCP-*like* y pacientes DCP; representados como media y SEM y p-valor de la comparación entre grupos.

b) Sistema oxidante-antioxidante.

El H_2O_2 (Figura 12a) presenta niveles aumentados en el grupo de pacientes con respecto al grupo control, aunque sin alcanzar significación estadística ($p=0,1721$). De igual forma, en la medida del $\cdot\text{O}_2^-$ total (Figura 12b) se observa un incremento en los pacientes respecto a los controles y a los DCP-like, sin embargo, sin mostrar diferencia estadística significativa ($p=0,0810$). Los niveles de NO (Figura 13a) no presentan cambios entre los grupos de estudio. La medida del GSH (Figura 13b) muestra un aumento estadísticamente significativo ($p=0,0072$) en los pacientes con DCP respecto al grupo control y un incremento, aunque no significativo, con respecto al grupo de pacientes DCP-like.

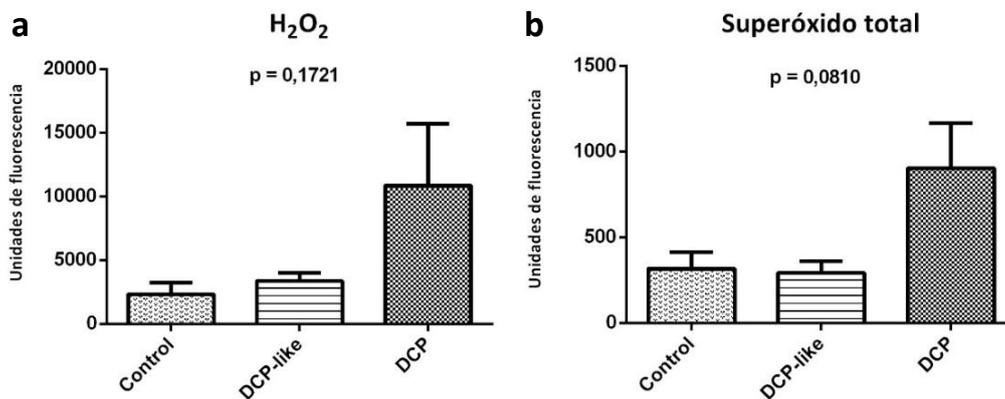


Figura 12. Niveles de producción de ROS: H_2O_2 (a) y $\cdot\text{O}_2^-$ (b) en los diferentes grupos analizados: controles, pacientes DCP-like y pacientes DCP; representados como media y SEM y p-valor de la comparación entre grupos.

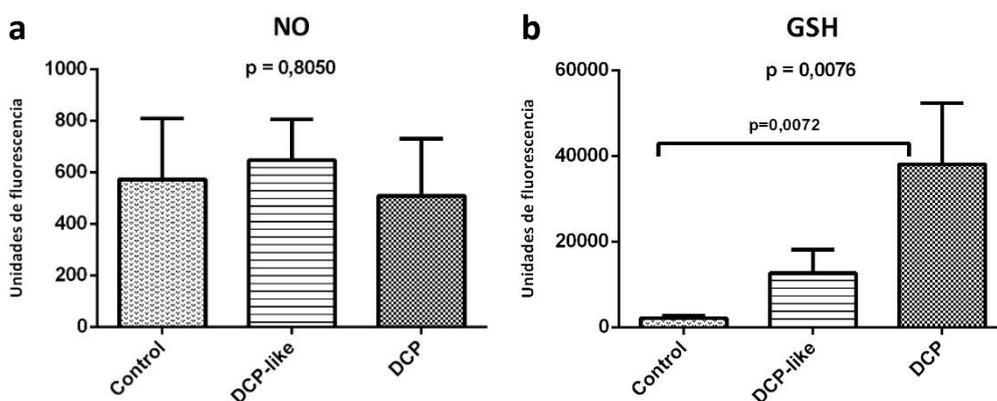


Figura 13. Niveles de producción de NO (a) y GSH (b) en los diferentes grupos analizados: controles, pacientes DCP-like y pacientes DCP; representados como media y SEM y p-valor de la comparación entre grupos.

c) Biomarcadores de daño oxidativo

No se observan diferencias significativas en los niveles de peroxidación lipídica ($p=0,3712$) (Figura 14a). Los niveles de proteínas carboniladas (Figura 14b) no presentan diferencias entre los grupos de estudio ($p=0,8087$).

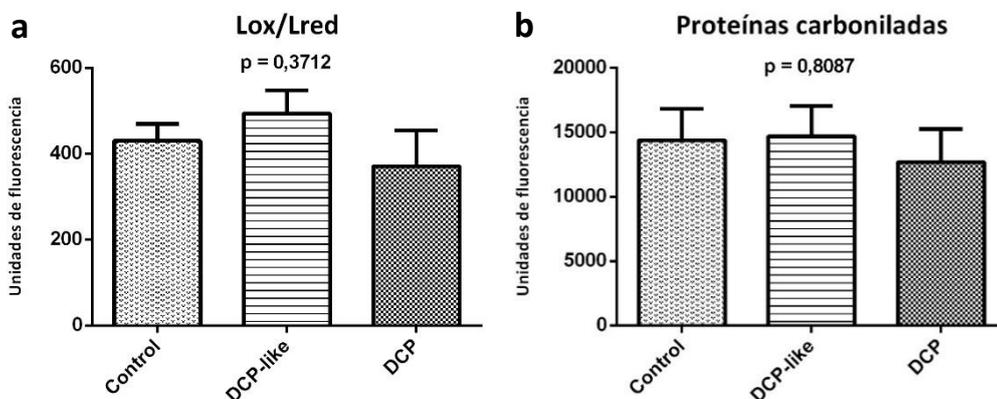
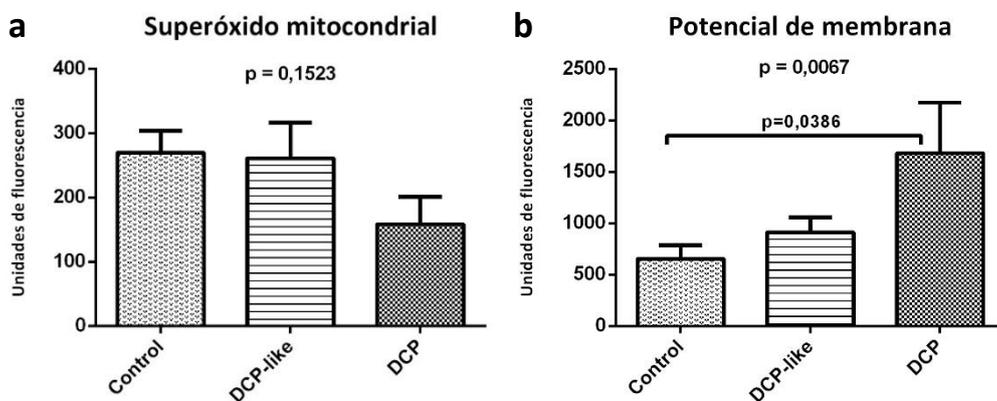


Figura 14. Niveles de oxidación en biomoléculas: Lox/Lred (a) y proteínas carboniladas (b) en los diferentes grupos analizados: controles, pacientes DCP-like y pacientes DCP; representados como media y SEM y p-valor de la comparación entre grupos.

d) Parámetros mitocondriales

El $\cdot O_2^-$ mitocondrial (Figura 15a) muestra una tendencia decreciente en el grupo de los pacientes respecto al grupo control y al grupo de pacientes DCP-like, sin que los resultados muestren significación estadística. El $\Delta\Psi_m$ mitocondrial (Figura 15b) presenta niveles aumentados en los pacientes respecto al resto de grupos, mostrando en comparación al grupo control diferencia significativa ($p=0,0386$). Por último, en la medida de masa mitocondrial (Figura 15c) no se observan diferencias entre los grupos de estudio.



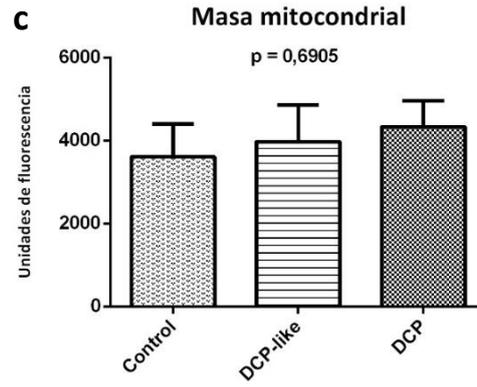


Figura 15. Niveles de oxidación mitocondrial: $\cdot\text{O}_2^-$ mitocondrial (a), $\Delta\Psi_m$ mitocondrial (b) y masa mitocondrial (c) en los diferentes grupos analizados: controles, pacientes DCP-like y pacientes DCP; representados como media y SEM y p-valor de la comparación entre grupos.

5. DISCUSIÓN

Los pacientes afectados con la patología de DCP se caracterizan por presentar cilios con un movimiento de batida ausente o alterado que condiciona el correcto funcionamiento de las células en aquellos órganos y tejidos que conforman (Lobo *et al.*, 2015). En concreto, la disfunción de las células ciliadas presentes en el epitelio respiratorio, impide la correcta eliminación de las secreciones mucosas de las vías aéreas, dando lugar a la condición inflamatoria crónica característica de estos pacientes (Noone *et al.*, 2004).

Actualmente el diagnóstico de esta patología se realiza con más frecuencia debido al mayor conocimiento de la enfermedad, así como a la disponibilidad de más herramientas para su detección. No obstante, aún permanece infradiagnosticada y carente de tratamiento. Se ha descubierto que en numerosas enfermedades la inflamación comparte una estrecha relación con un estado de estrés oxidativo (Elejalde, 2001). Puesto que el estado inflamatorio de las vías aéreas se constituye como principal manifestación clínica en la DCP, resulta de gran importancia incidir en el conocimiento de las características fisiológicas que presenta el tejido propiamente afectado, en concreto las células ciliadas que componen el epitelio nasal respiratorio.

De esta manera, se estableció como objetivo la caracterización del perfil oxidativo en condiciones basales de las células ciliadas del epitelio nasal en tres grupos de estudio: controles sanos, pacientes con DCP y pacientes DCP-*like*. Estos últimos son pacientes con sospecha clínica de la enfermedad, aunque función ciliar normal y por tanto diagnóstico negativo.

En base a los resultados obtenidos, se han observado diferencias significativas en dos parámetros: GSH y $\Delta\Psi_m$ mitocondrial. El primero de ellos, correspondiente a la principal molécula de la defensa antioxidante, presenta niveles aumentados en el grupo de los pacientes con DCP respecto al grupo control. El aumento en la producción del tripéptido tiol sugiere que la célula experimenta una necesidad de contrarrestar la presencia de un efecto citotóxico. De hecho, según indican los niveles de $\cdot O_2^-$ total y H_2O_2 evaluados en los pacientes, se observa una tendencia al aumento de la producción de estas especies, que justificaría la activación de la defensa antioxidante. Una observación similar ocurre en la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), patología que comparte algunos síntomas clínicos con la DCP, en la que se han descrito niveles elevados de H_2O_2 así como un incremento del GSH en el fluido de los lavados broncoalveolares de los pacientes (Domej *et al.*, 2014).

De este modo, a fin de favorecer el equilibrio de la oxidorreducción, la célula centraría sus esfuerzos en producir grandes cantidades de GSH, sustrato que la enzima GPx emplea para catalizar la conversión del H_2O_2 a H_2O y O_2 . Y con el objetivo de reciclar el GSH a partir de su forma oxidada GSSG, se activarían rápidamente las cascadas antioxidantes, en las que la GRx generaría de nuevo el tripéptido tiol y se restauraría el entorno reductor en la célula (Macnee, 2001).

Al plantear esta hipótesis, surge la pregunta de si, realmente los altos niveles de producción de GSH son producto de una excelente eficiencia en el sistema de recuperación de la forma oxidada, o por el contrario, su formación atiende a vías de síntesis *de novo*. Las investigaciones realizadas por Borzone *et al.* (2009) en un estudio sobre el metabolismo del GSH, demostraron que tras la inducción de enfisema pulmonar con elastasa en roedores, estos utilizaban una vía alternativa de síntesis cuando se agotaba el reciclaje de la molécula antioxidante a partir de su forma oxidada. De esta manera, ante la necesidad de combatir el daño pulmonar, se excretaba el acúmulo de GSSG y se empleaba una ruta alternativa para restaurar los niveles del tripéptido tiol, determinada por un aumento en la enzima gamma-glutamilcisteína-sintetasa encargada de la síntesis *de novo* del GSH. Así, para determinar si el sistema del GSH presenta una mayor

capacidad de síntesis en estas células, sería necesario evaluar la relación GSH/GSSG, así como la actividad de las principales enzimas de síntesis y metabolismo de este antioxidante.

Por otra parte, la medida del $\Delta\Psi_m$ mitocondrial presenta niveles aumentados, de forma estadísticamente significativa, en pacientes con DCP con respecto a los controles. Cualquier alteración que afecte a la estabilidad de la cadena respiratoria constituye una importante fuente de producción de ROS en la célula, así se ha descubierto que muchas patologías caracterizadas por una condición inflamatoria presentan un $\Delta\Psi_m$ mitocondrial inhibido (Beltrán *et al.*, 2013). Sin embargo, contrario a lo anterior, los resultados de este estudio sugieren un aumento de la velocidad del transporte electrónico mitocondrial, que resultaría en una superproducción de ROS además de un incremento en la producción de ATP. Este último podría estar justificado porque las células pretenden restaurar la movilidad ciliar, caracterizada por ser ATP-dependiente.

El incremento en la actividad mitocondrial podría explicar el alto nivel de $\cdot O_2^-$ total detectado en las células de los pacientes, que puede proceder de la mitocondria o bien de otras rutas intrínsecas a nivel de citosol. Como se describe anteriormente, las mediciones de los niveles de ROS no presentan significatividad estadística, sin embargo, sí se observan niveles aumentados de H_2O_2 y $\cdot O_2^-$ en los pacientes con DCP respecto a los controles. Este aumento podría correlacionarse con el estado de estrés oxidativo que describieron las investigaciones de Zihlif *et al.* (2006) en el condensado de aire exhalado en niños con DCP, en la que se detectaron altos niveles del biomarcador de estrés oxidativo 8-isoprostano (8-IP) en comparación con el grupo control. El mismo fenómeno en los niveles de ROS se ha descrito en otras patologías de carácter inflamatorio, como es el caso del estudio realizado por Oliveira *et al.* (2013), en el que se determinaron niveles incrementados de H_2O_2 y $\cdot O_2^-$ total en pacientes con bronquiectasias, que coincidirían con los datos observados en el presente estudio.

Por otro lado, se ha analizado el nivel de NO. Este mediador biológico formado como consecuencia de la acción de la enzima NO sintetasa, se encuentra en la mayoría de las células de las vías aéreas, ya sean constitutivas o inflamatorias. Es bien conocido que el nivel de NO en el aire exhalado de pacientes con DCP se encuentra disminuido de manera notable y por ello su empleo como herramienta para el diagnóstico se ha extendido ampliamente en la práctica clínica (Walker *et al.*, 2012). En el presente estudio, los resultados obtenidos en la medida de este parámetro presentan cierta controversia con lo anteriormente descrito, pues no se observan diferencias significativas entre el grupo de pacientes con DCP y el grupo control. No obstante, se han encontrado casos de pacientes con DCP que presentaban niveles de NO en aire exhalado dentro del rango normal e incluso superior, que han puesto en duda la validez del empleo de esta prueba diagnóstica de manera aislada (Marthin y Nielsen, 2011).

Es posible que los valores de NO que presenta el grupo de pacientes, y que distan de parecerse a aquellos establecidos en los test diagnósticos positivos para la DCP, encuentren su explicación en la condición de obstrucción al flujo aéreo característica de la enfermedad. Se han observado niveles de NO elevados en el esputo de pacientes con fibrosis quística, que sugieren la posibilidad de que esta molécula quede atrapada en las secreciones mucosas que se acumulan en exceso en las vías respiratorias, dificultando su difusión intraluminal, al tiempo que reacciona con otras especies reactivas para formar nitritos/nitratos (Ho *et al.*, 1998). Los trabajos realizados por Bush *et al.* (2006) demostraron una gran similitud en las propiedades biofísicas del esputo de pacientes con DCP y pacientes con fibrosis quística, indicando presencia de mayor inflamación en los primeros. Así, podría establecerse que cuanto mayor es la producción de

moco, menor es la concentración de NO en el condensado de aire exhalado y mayor la de nitratos (Palop-Cervera *et al.*, 2009). No obstante esto deberá ser confirmado en posteriores estudios.

En referencia a los niveles de proteínas carboniladas y lípidos peroxidados, no se observan diferencias entre el grupo de pacientes con DCP y el grupo control. La aparente ausencia de daño en las biomoléculas podría explicar que las células presenten un sistema antioxidante que favorece su protección ante el exceso de especies reactivas. Esto es, que la actividad antioxidante del GSH podría priorizar la protección de las biomoléculas en lugar de la neutralización de las ROS, encontrando además un mecanismo de almacenamiento que ayudase a preservar los niveles de GSH intracelulares. Esto lo llevaría a cabo mediante la modificación postraduccional reversible S-glutationalización, mediante la que protege los grupos tiol cisteína de las proteínas de sufrir oxidación irreversible (Dalle-donne *et al.*, 2007). Como se ha observado en previas investigaciones (Peltoniemi *et al.*, 2006), la enzima glutaredoxina (Grx), encargada de reducir las proteínas glutationiladas a fin de devolverles su función y restaurar los niveles de GSH, presenta elevados niveles en los macrófagos alveolares de los pacientes con EPOC. Esto sugiere que, ante condiciones de oxidación, esta puede ser una vía adoptada por los mecanismos antioxidantes para la protección de las proteínas, y sería de interés medir en las células de estos pacientes.

Asimismo, no se han encontrado diferencias en los niveles de apoptosis entre pacientes y controles. Por tanto, a falta de evaluar el daño oxidativo en el DNA, los resultados obtenidos parecen señalar que el sistema antioxidante desempeña una importante función de protección en estas células.

Los resultados referentes a la medida de los parámetros mitocondriales $\cdot\text{O}_2^-$ y masa mitocondrial, no presentan diferencias significativas. Aun así, se observa una disminución en el $\cdot\text{O}_2^-$ mitocondrial de los pacientes, que quizá atienda a una rápida exportación de esta especie reactiva al citosol o a un eficiente sistema de defensa antioxidante mitocondrial. En cuanto a lo último, podría establecerse que, la diferencia de superóxido a ambos lados de la membrana mitocondrial se deba a una diferente actividad de las isoformas SOD que catalizan su dismutación (Le Bras *et al.*, 2014). De esta manera, la enzima mitocondrial manganeso (Mn)-SOD podría presentar una actividad más elevada que la enzima citoplasmática Cobre- Zinc (Cu/Zn) – SOD, ayudando así a mantener la integridad del orgánulo energético, tal y como parece indicar el nivel de masa mitocondrial de los pacientes.

Adicionalmente, se evaluó el grupo de pacientes DCP-*like*. Los resultados obtenidos en este grupo no presentan diferencias significativas en la medida de ninguno de los parámetros con respecto al grupo control. De ello podría deducirse que, a pesar de la similitud fenotípica de este grupo *like* con los pacientes DCP, las diferencias a nivel celular descritas por una función de movilidad ciliar normal en los primeros, pueden explicar que se hayan encontrado características fisiológicas tan similares al grupo con células sanas.

Resulta preciso subrayar que debido a que la DCP es una enfermedad considerada como “rara”, esto ha supuesto una importante limitación en el desarrollo del proyecto. Dada la baja prevalencia con que se presenta en la sociedad, la dificultad en el reclutamiento de pacientes ha condicionado el tamaño muestral del estudio y con ello la obtención de resultados significativos. Por otra parte, el volumen de muestra del que se ha dispuesto en ocasiones ha resultado insuficiente para el diseño experimental empleado en este estudio. Esto ha impedido

alcanzar el número de células necesario para efectuar la medida de todos los parámetros, obligando a analizar un mayor número de pacientes y controles para validar los resultados.

Para continuar este trabajo, sería de gran interés profundizar en el estudio del perfil oxidativo para comprobar la validez de las hipótesis que se han planteado de acuerdo a los resultados obtenidos. Sin embargo, esta tarea requiere trabajar con mayores cantidades de células. Por ello sería de gran utilidad desarrollar cultivos primarios de células epiteliales nasales mediante la técnica interfaz aire-líquido (ALI) (Müller *et al.*, 2013), que permite simular *in vitro* las condiciones del epitelio nasal *in vivo* y así amplificar en gran medida la población de células obtenidas en la biopsia. De esta manera, podría abarcarse el estudio de un mayor número de parámetros de oxidación, evaluar el estado de daño oxidativo en la molécula de ADN y estudiar niveles de expresión enzimática, que ayudarían a mejorar la comprensión acerca el comportamiento del sistema de defensa antioxidante de las células de estos pacientes.

6. CONCLUSIONES

En vista de los resultados obtenidos, pueden extraerse una serie de conclusiones, que se describen a continuación.

Las células ciliadas del epitelio nasal de pacientes con DCP presentan un incremento en el $\Delta\Psi_m$ mitocondrial respecto a los controles, sugiriendo una posible sobreproducción de ATP para tratar de reparar la deficiencia de la función motora ciliar que caracteriza la enfermedad. La alteración en la cadena de transporte de electrones propone a este orgánulo como posible fuente de producción de ROS en los pacientes con DCP, que manifiestan niveles de $\cdot O_2^-$ total y H_2O_2 aumentados con respecto al grupo control. No obstante, se observa un aumento estadísticamente significativo en los niveles de GSH en los pacientes, que parece ir dirigido a contrarrestar el exceso de especies reactivas. La eficacia del sistema de defensa de los pacientes puede ser responsable de la ausencia de daño oxidativo en lípidos y proteínas, así como los niveles normales de apoptosis en estos pacientes. Por otra parte, no se observan diferencias en la masa mitocondrial entre los grupos de pacientes y controles, indicando que este orgánulo mantiene su integridad. No se han encontrado diferencias significativas en los niveles de $\cdot O_2^-$ mitocondrial, salvo una ligera disminución en los pacientes, que podría deberse a un mejor funcionamiento de la SOD mitocondrial frente a la citosólica. El NO presenta valores normales en los pacientes con DCP, que sugieren la existencia de un correcto funcionamiento de las enzimas que se encargan de su producción en las células de la vía aérea y, sin embargo, que la disminución de este radical en el aire exhalado se deba a una retención en las secreciones mucosas que se acumulan en las vías respiratorias.

En cuanto al grupo de pacientes *DCP-like*, este presenta en todos los parámetros evaluados niveles similares a los controles, y por consiguiente, diferentes al grupo de pacientes con DCP, lo que sugiere que, pese a presentar similares manifestaciones clínicas, las diferentes características fisiológicas se atribuyan a la presencia de movilidad ciliar normal.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. ALFADDA, A. A. & SALLAM, R. M. (2012). Reactive oxygen species in health and disease. *BioMed Research International.*, 1-14.
2. ARMENGOT, M., MATA, M., MILARA, X. & CORTIJO, J. (2010). Discinesia ciliar primaria. Ciliopatías. *Acta Otorrinolaringológica Española.*, 61(2), 149-159.
3. ARMENGOT, M., BONET, M., CARDA, C., GÓMEZ, M. J., MILARA, J., MATA, M. & CORTIJO, J. (2012). Development and validation of a method of cilia motility analysis for the early diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Acta Otorrinolaringológica.*, 63(1), 1-8.
4. BEHERA, R., GOEL, S., DAS, S., BOUZAHZAH, B., DOMANN, N., MAHAPATRA, A. ET AL. (2014). Oxidative Stress in Alzheimer's Disease : Targeting with Nanotechnology. *Biochemical and Biophysical Journal of Neutron Therapy & Cancer Treatments.*, 2(1), 18-26.
5. BELTRÁN, B., NOS, P., DASÍ, F., IBORRA, M., BASTIDA, G., MARTÍNEZ, M. ET AL. (2010). Mitochondrial dysfunction, persistent oxidative damage, and catalase inhibition in immune cells of naive and treated Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases.*, 16(1), 76-86.
6. BIOTECH SPAIN (2011). *Citometría de flujo: midiendo células.*, visto el 10 de marzo de 2016, https://biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=1104a_tecnica_citometra
7. BISWAS, S. K. & RAHMAN, I. (2009). Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Molecular aspects of medicine.*, 30(1), 60-76.
8. BISWAS, S. K. (2016). Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.*, vol. 2016, 17-19.
9. BOON, M., JORISSEN, M., PROESMANS, M. & DE BOECK K. (2013). Primary ciliary dyskinesia, an orphan disease. *Eur J Pediatr.* 172(2), 151-162.
10. BORZONE, G. R., LIBERONA, L. F., BUSTAMANTE, A. P., SAEZ, C. G., OLMOS, P. R., VECCHIOLA, A. ET AL. (2009). Differences in lung glutathione metabolism may account for rodent susceptibility in elastase-induced emphysema development. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.*, 296(4), 1113-1123.
11. BROWN, J.M. & WITMAN, G.B. (2014). Cilia and Diseases. *BioScience.*, 64(12), 1126-1137.
12. BUKOWY, Z., ZIĘTKIEWICZ, E. & WITT, M. (2011). In vitro culturing of ciliary respiratory cells - a model for studies of genetic diseases. *Journal of applied genetics.*, 52(1), 39-51.
13. BUSH, A., PAYNE, D., PIKE, S., JENKINS, G., HENKE, M. O. & RUBIN, B. K. (2006). Mucus properties in children with primary ciliary dyskinesia: comparison with cystic fibrosis. *CHEST Journal.*, 129(1), 118-123.
14. BUSH, A., CHODHARI, R., COLLINS, N., COPELAND, F., HALL, P., HARCOURT, J. ET AL. (2007). Primary ciliary dyskinesia: current state of the art. *Arch Dis Child.*, 92, 1136-1140.
15. CHILVERS, M. A., RUTMAN, A. & O'CALLAGHAN, C. (2003). Ciliary beat pattern is associated with specific ultrastructural defects in primary ciliary dyskinesia. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.*, 112(3), 518-524.

16. DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., GIUSTARINI, D., COLOMBO, R. & MILZANI, A. (2007). S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radical Biology and Medicine.*, 43(6), 883-898.
17. DÍAZ-ACOSTA, A. E. & MEMBRILLO-HERNÁNDEZ, J. (2006). Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Rev Esp Cienc Quim Biol.*, 9 (1), 34-44.
18. DOMEJ, W., OETTL, K. & RENNER, W. (2014). Oxidative stress and free radicals in COPD—implications and relevance for treatment. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease.*, 9, 1207.
19. ELEJALDE GUERRA, J. I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna.*, 18(6), 50-59.
20. ESCUDIER, E., DUQUESNOY, P., PAPON, J. F. & AMSELEM, S. (2009). Ciliary defects and genetics of primary ciliary dyskinesia. *Paediatric Respiratory Reviews.*, 10(2), 51-54.
21. FERKOL, T., MITCHISON, H.M., O'CALLAGHAN, C., LEIGH, M., CARSON, J., ROSENBLUTH, D. & BRODY, S.L. (2006). Current issues in the basic mechanisms, pathophysiology, diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *European Respiratory Monograph.*, 37, 291-313.
22. FIGUEIRA, T. R., BARROS, M. H., CAMARGO, A. A., CASTILHO, R. F., FERREIRA, J. C., KOWALTOWSKI, A. J. ET AL. (2013). Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxidants & redox signaling.*, 18(16), 2029-2074.
23. FLIEGAUF, M., BENZING, T. & OMRAN, H. (2007). When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology.*, 8(11), 880-893.
24. GUPTA, R. K., PATEL, A. K., SHAH, N., CHOUDHARY, A.K., JHA, U.K., YADAV, U. C. ET AL. (2014). Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.*, 15(11), 4405-4409.
25. HAJJ, R., BARANEK, T., LE NAOUR, R., LESIMPLE, P., PUCHELLE, E. & CORAUX, C. (2007). Basal Cells of the Human Adult Airway Surface Epithelium Retain Transit-Amplifying Cell Properties. *Stem Cells.*, 25(1), 139-148.
26. HO, L. P., INNES, J. A., & GREENING, A. P. (1998). Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax.*, 53(8), 680-684.
27. HOSIE, P., FITZGERALD, D. A., JAFFE, A., BIRMAN, C. S. & MORGAN, L. (2014). Primary ciliary dyskinesia: Overlooked and undertreated in children. *Journal of Paediatrics and Child Health.*, 50(12), 952-958.
28. KALYANARAMAN, B., DARLEY-USMAR, V., DAVIES, K. J., DENNERY, P. A., FORMAN, H. J., GRISHAM, M. B. ET AL. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine.*, 52(1), 1-6.

29. KIM, R. H., HALL, D. A., CUTZ, E., KNOWLES, M. R., NELLIGAN, K. A., NYKAMP, K., ZARIWALA, M. & DELL, S. D. (2014). The role of molecular genetic analysis in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Annals of the American Thoracic Society.*, 11(3), 351–359.
30. KNOWLES, M. R., DANIELS, L. A., DAVIS, S. D., ZARIWALA, M. A. & LEIGH, M. W. (2013). Primary Ciliary Dyskinesia. Recent Advances in Diagnostics, Genetics, and Characterization of Clinical Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.*, 188(8), 913–922.
31. KURZ, D. J., DECARY, S., HONG, Y., TRIVIER, E., AKHMEDOV, A., & ERUSALIMSKY, J. D. (2004). Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *Journal of cell science.*, 117(11), 2417-2426.
32. LE BRAS, M., CLEMENT, M. V., PERVAIZ, S. & BRENNER, C. (2005). Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol.*, 20, 205-220.
33. LEE, Y. M., SONG, B. C. & YEUM, K. J. (2015). Impact of Volatile Anesthetics on Oxidative Stress and Inflammation. *BioMed research international.*, vol.2015, 1-8.
34. LEIGH M.W, PITTMAN J.E, CARSON J.L, FERKOL T.W, DELL S.D, DAVIS S.D, KNOWLES M.R. & ZARIWALA M.A. (2009). Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener syndrome. *Genet. Med.*, 11(7),473-487.
35. LOBO, J., ZARIWALA, M. & NOONE, P.G. (2015). Primary Ciliary Dyskinesia. *Semin Respir Crit Care Med.*, 36, 169-179.
36. LUCAS, J. S., BURGESS, A., MITCHISON, H. M., MOYA, E., WILLIAMSON, M. & HOGG, C. (2014). Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Archives of disease in childhood.*, 0:1-7.
37. MACNEE, W. (2001). Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *European journal of pharmacology.*, 429(1), 195-207.
38. MARTHIN, J. K. & NIELSEN, K. G. (2011). Choice of nasal nitric oxide technique as first-line test for primary ciliary dyskinesia. *European Respiratory Journal.*, 37(3), 559-565.
39. MUKHOPADHYAY, P., RAJESH, M., YOSHIHIRO, K., HASKÓ, G. & PACHER, P. (2007). Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochemical and biophysical research communications.*, 358(1), 203-208.
40. MÜLLER, L., BRIGHTON, L. E., CARSON, J. L. & FISCHER, W. A. (2013). Culturing of human nasal epithelial cells at the air liquid interface. *Journal of visualized experiments: JoVE.*, (80), 1-7.
41. NOONE, P. G., LEIGH, M. W., SANNUTI, A., MINNIX, S. L., CARSON, J. L., HAZUCHA, M. ET AL. (2004). Primary ciliary dyskinesia: diagnostic and phenotypic features. *American journal of respiratory and critical care medicine.*, 169(4), 459-467.
42. OLVEIRA, G., OLVEIRA, C., DORADO, A., GARCÍA-FUENTES, E., RUBIO, E., TINAHONES, F. ET AL. (2013). Cellular and plasma oxidative stress biomarkers are raised in adults with bronchiectasis. *Clinical nutrition.*, 32(1), 112-117.

43. PALOP-CERVERA, M., DE DIEGO DAMIÁ, A., MARTÍNEZ-MORAGÓN, E., CORTIJO, J., FULLANA, J., & LEÓN, M. (2009). Estudio de marcadores de inflamación en el aire exhalado de pacientes con bronquiectasias no asociadas a fibrosis quística. *Archivos de Bronconeumología.*, 45(12), 597-602.
44. PAMPLONA, R. & COSTANTINI, D. (2011). Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.*, 301 (4), 843-863.
45. PELTONIEMI, M. J., RYTILÄ, P. H., HARJU, T. H., SOINI, Y. M., SALMENKIVI, K. M., RUDDOCK, L. W. & KINNULA, V. L. (2006). Modulation of glutaredoxin in the lung and sputum of cigarette smokers and chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research.*, 7(1), 133.
46. POPATIA, R., HAVER, K. & CASEY, A. (2014). Primary Ciliary Dyskinesia: An Update on New Diagnostic Modalities and Review of the Literature. *Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology.*, 27(2), 51-59.
47. PRIMARY CILIARY DYSKINESIA (PCD) FOUNDATION (2002). Minnesota, United States., visto el 10 de enero de 2016,
<http://www.pcdfoundation.org/es/about-pcd?format=pdf>
48. SCADUTO, R. C. & GROTYOHANN, L. W. (1999). Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophysical journal.*, 76(1), 469-477.
49. ST. MICHAEL'S HOSPITAL. *Cell viability/Apoptosis*. Toronto, Canada., visto el 20 de febrero de 2016,
<http://stmichaelshospitalresearch.ca/staff-services/research-facilities/facilities/flow-cytometry-core/cell-viability-apoptosis/>
50. STRIPPOLI, M. P. F., FRISCHER, T., BARBATO, A., SNIJDERS, D., MAURER, E., LUCAS, J. S. ET AL. (2012). Management of primary ciliary dyskinesia in European children: recommendations and clinical practice. *European Respiratory Journal.*, 39(6), 1482-1491.
51. WALKER, W. T., JACKSON, C. L., LACKIE, P. M., HOGG, C. & LUCAS, J. S. (2012). Nitric oxide in primary ciliary dyskinesia. *European Respiratory Journal.*, 40(4), 1024-1032.
52. WEIDINGER, A. & KOZLOV, A. V. (2015). Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules.*, 5(2), 472-484.
53. ZHANG, G., GURTU, V., KAIN, S. R. & YAN, G. (1997). Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques.*, 23(3), 525-531.
54. ZIHLIF, N., PARASKAKIS, E., TRIPOLI, C., LEX, C. & BUSH, A. (2006). Markers of airway inflammation in primary ciliary dyskinesia studied using exhaled breath condensate. *Pediatric pulmonology.*, 41(6),509-514.

8. ANEXOS

I. Aprobación del Comité Ético y de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia para este estudio.



INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL HOSPITAL CLINIC UNIVERSITARI DE VALENCIA

D. Manuel Labiós Gómez, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic Universitari de Valencia

CERTIFICA

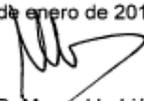
Que en este Comité, en su reunión de fecha 29 de enero de 2015, y según consta en el acta de la misma, se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación que lleva por título:

Caracterización del estrés oxidativo en células epiteliales nasales de pacientes con Discinesia Ciliar Primaria.

Que será llevado a cabo en el Servicio de Pediatría y cuyo investigador principal es la Dra. Amparo Escribano Montaner, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la ***Declaración de Helsinki*** (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong Kong), (Octubre 1996, Somerset West, Sudáfrica), (Octubre 2000, Edimburgo), (Octubre 2008 Seúl, Corea) y (Octubre 2013 Fortaleza, Brasil) y en la ***Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO*** y los acuerdos del ***Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a la aplicaciones de la biología y de la medicina*** (Paris 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Lo que certifico a efectos oportunos.

Valencia, 29 de enero de 2015.


Fdo. : Dr. D. D. Manuel Labiós Gómez
Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica

II. Aprobación del Comité Ético y de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia para este estudio.



Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- ANEXO 11 -

Este CEIC tras evaluar en su reunión de 26 de Febrero de 2015 el Proyecto de Investigación:

Título:	Caracterización del estrés oxidativo en células epiteliales nasales de pacientes con Discinesia Ciliar Primaria		
I.P.:	Miguel Armengot Carceller	Servicio/Unidad	Otorrino

Acuerda respecto a esta documentación:

Que la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado presentado reúnen las condiciones exigidas por este CEIC, por tanto se decide su APROBACIÓN.

Los miembros que evaluaron esta documentación:

		Presente	Ausente	Disculpa
Presidente	Dr. Severiano Marín Bertolín	x		
	D. Ernesto Balallar Alonso			x
	D. Alejandro Moner González			x
Miembros Lego	Dña. M ^a Teresa Jareño Roglan		x	
	Dña. Encarna Domingo Cebrán	x		
	D. Jaime Alagón Pérez	x		
	Dña. Carmen Sarmiento Cabeñes	x		
	D. Antonio Baltasar Olivas Nevado		x	
	Dr. D. José Manuel Itanzo Miguélez		x	
	Dr. D. Miguel Armengot Carceller	x		
Vocales	Dr. D. Julio Cortijo Gimeno	x		
	Dra. Dña. Elena Rubio Gomis	x		
	Dr. D. Gustavo Juan Samper	x		
	Dra. Pilar Blasco Segura	x		
	Dra. M ^a José Salort Aguilera		x	
	Dra. Ana Blasco Cordellat	x		



Centro Hospital General Universitario de Valencia
Comité Ético de Investigación Clínica

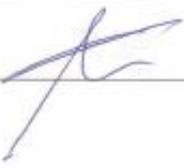
	Presente	Ausente	Disculpa
Dr. Antonio Mariorell Aragonés	X		
Dr. Aurelio Quesada Dorador	X		
Dr. Pedro Polo Marín	X		
Dra. Inmaculada Sáez Ferrer	X		
Dr. Alberto Berenguer Jofresa	X		
Dra. Goltzani Marcolida Benito			X
Dr. Javier Milara Payá	X		
Secretario Dra. Ana Mínguez Martí	X		

En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente- Real Decreto 223/2004- para que la decisión del citado CEIC sea válida. El CEIC en su composición, como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMPICH/13595).

Lo que comunico a efectos oportunos:

Valencia a 10 de marzo de 2015

Fdo. Dr. Severiano Marín
(Presidente del CEIC CHGU/V)



III. Modelo de Consentimiento Informado para sujetos participantes en este estudio.

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Le ofrecemos la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado **“Caracterización del estrés oxidativo en células epiteliales nasales de pacientes con Discinesia Ciliar Primaria”** que está siendo realizado por la Dra. Amparo Escribano, en la Unidad de Neumología infantil y Fibrosis Quística del Servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario y por el Dr. Miguel Armengot, en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital General Universitario, de Valencia.

Antecedentes:

La Discinesia Ciliar Primaria (DCP) es un trastorno hereditario, que afecta a 1 de 10.000-60.000 individuos, por lo que se considera como una enfermedad rara por la baja frecuencia de aparición. Esta causada por una falta total de cilios o una irregularidad de la función ciliar que, o bien impide que los cilios puedan moverse (síndrome del cilio inmóvil), o que lo hagan de forma adecuada (discinesia ciliar). En ambos casos, los cilios no pueden cumplir con la función de transporte y/o de eliminación de los desechos tóxicos del organismo, lo que, en el aparato respiratorio, va a provocar un acúmulo constante de moco en las vías aéreas haciendo mucho más fáciles y frecuentes las infecciones y, a la larga, el daño pulmonar. Este trastorno afecta también al espermatozoide por lo que es común la esterilidad en varones y a los cilios del aparato genital femenino, generándoles una fertilidad reducida en mujeres.

Lo que más va a determinar la evolución y pronóstico de esta enfermedad, es la inflamación e infección crónica de la vía aérea, que podría estar propiciada por la existencia de un incremento de la oxidación de los componentes celulares del epitelio respiratorio, lo que se conoce como “estrés oxidativo”, un desbalance entre los agentes antioxidantes y oxidantes.

Para estudiar este estrés oxidativo y su posible papel en la evolución de la afectación respiratoria de las personas que tienen esta enfermedad, se van a realizar cultivos de las células del epitelio nasal determinando, en ellos, su perfil oxidativo. Los resultados obtenidos, nos permitirán conocer el estado inflamatorio de cada sujeto, y sugerir posibles tratamientos antioxidantes que mejoren su condición.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

Determinar el perfil de estrés oxidativo en células ciliadas del epitelio nasal de pacientes con Discinesia Ciliar Primaria (DCP), y relacionar estos parámetros con su situación clínica, para encontrar posibles dianas terapéuticas que pueda mejorar su condición.

¿Por qué se te ha pedido que participe?

Para dilucidar si el estrés oxidativo es determinante, o no, de la inflamación y daño respiratorio presentes en los pacientes con DCP, es necesario comparar los datos que se obtengan con los de otras personas afectas de enfermedades respiratorias de distinto origen, pero que también producen inflamación y daño pulmonar, y con personas sanas. Por ello, el estudio incluye a 4 grupos de pacientes: (1) diagnosticados de DCP; (2) con síntomas similares, pero en los que se ha descartado la DCP con test que son diagnósticos y definitivos; (3) con otra enfermedad respiratoria diagnosticada que curse con inflamación crónica y (4) sanos.

Dado que perteneces a uno de estos grupos (1, 2, 3 ó 4), se te pide tu participación en este estudio.

¿En qué consiste su participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se le realizarán?

Se le solicita permiso para utilizar con fines científicos **una muestra de tu epitelio respiratorio ciliado nasal obtenido por medio de un raspado superficial en el cornete medio nasal, que proporciona una muestra biópsica con la previa aplicación de anestesia tópica.**

La participación en el presente proyecto no supone ninguna alteración del tratamiento que esté llevando (si lo tiene) y todo tratamiento que se le pueda poner a partir de los estudios clínico-bioquímicos que se le realicen, será siempre bajo criterio médico.

¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio?

Si perteneces a los grupos 1 o 2, ya habrás sido sometido (a) a la prueba diagnóstica de DCP que, como sabes, consiste en un raspado nasal para obtener una muestra de células ciliadas, por lo que conoces que la técnica es sencilla, rápida y prácticamente exenta de ningún riesgo. Tan sólo notarás una pequeña molestia en el punto del raspado que, sólo ocasionalmente, puede acompañarse de un leve sangrado local que, en caso que se produzca, cede de forma inmediata con una simple presión.

Si perteneces a los grupos 3 o 4, la toma de muestra nasal la efectúa alguno de los 2 otorrinolaringólogos que forman parte del grupo investigador, expertos en esta técnica, y consiste en aplicar localmente anestesia e introducir una cureta que rasará superficialmente la cavidad del cornete medio nasal. Además, es posible que si perteneces al grupo 4, la toma se efectuará durante el acto quirúrgico al que va a ser sometido, efectuándola el mismo cirujano otorrinolaringólogo que le va a operar, incluyendo el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente.

Éstas técnicas de raspado nasal no entrañan ningún riesgo para su salud.

¿Cuáles son los beneficios de la participación en este estudio?

Es muy posible que los resultados obtenidos en esta investigación tengan poco valor diagnóstico o predictivo para ti, pero podrá ayudar a conocer mejor su enfermedad y mejorar el pronóstico y el tratamiento de futuros pacientes.

¿Qué pasará si decido no participar en este estudio?

Tu participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que decida no participar en él, esta decisión no modificará el trato y seguimiento que realicen su médico y el resto del personal sanitario que se ocupa de tu enfermedad. Así mismo, podrá retirarse del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

¿A quién puedo preguntar en caso de duda?

Es importante que comente con cualquiera de los investigadores de este proyecto los pormenores o dudas que surjan, antes de firmar el consentimiento para su participación.

Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el

investigador principal del proyecto, la **Dra. Amparo Escribano Montaner** en el teléfono **961 973 879**.

Confidencialidad:

Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con tu enfermedad será tratada con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Así mismo, si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas, en ningún momento se proporcionarán datos personales de los pacientes que han colaborado en esta investigación.

Tal y como contempla la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal, podrá ejercer su derecho a acceder, rectificar o cancelar sus datos contactando con el investigador principal de este estudio.

¿Qué pasará con las muestras biológicas obtenidas durante la investigación?

Durante su participación en este estudio, se obtendrá una muestra del epitelio respiratorio ciliado nasal. Las muestras biológicas serán almacenadas durante un periodo de 15 años en un congelador de -80 °C localizado en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina en el piso 2E, bajo la responsabilidad del Dr. Francisco Dasí Fernández. Estas muestras serán siempre utilizadas con fines científicos, pudiéndose utilizar, si tu así lo autorizas, en el marco de otros proyectos de investigación que tengan como objetivo el estudio de su enfermedad y que previamente hayan sido evaluados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital.

Además, este material no será bajo ningún concepto, ni en ningún momento, motivo de lucro, ni por su venta del material, ni por la cesión de los derechos para realizar estudios sobre el mismo.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto titulado: **Caracterización del estrés oxidativo en células epiteliales nasales de pacientes con Discinesia Ciliar Primaria**

Investigadora principal: **Dra. Amparo Escribano Montaner**

Servicio: Unidad de Neumología infantil y Fibrosis quística del Servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario de Valencia

Yo, _____ he sido informado por el Dr. _____, colaborador del proyecto de investigación arriba mencionado, y declaro que:

- He leído la Hoja de Información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas
- He recibido suficiente información sobre el estudio
- Comprendo que mi participación es voluntaria
- Comprendo que todos mis datos serán tratados confidencialmente
- Comprendo que puedo retirarme del estudio:
 - Cuando quiera
 - Sin tener que dar explicaciones
 - Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Autorizo a que las muestras obtenidas durante el proyecto de investigación sean utilizadas con fines científicos en otros proyectos de investigación que tengan por objeto el estudio de mi enfermedad y que hayan sido aprobados por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia

Sí No

Quiero que se me pida autorización previa para utilizar mis muestras biológicas para futuros proyectos de investigación

Sí No

Con esto doy mi conformidad para participar en este estudio,

Firma del paciente o tutor legal:

Fecha:

Firma del Investigador:

Fecha