



UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA
PROGRAMA DE DOCTORADO:
FISIOLÓGIA (3127)

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL EPITELIO NASAL
CILIADO DE PACIENTES CON DISCINESIA CILIAR PRIMARIA**

ANA REULA MARTÍN

Directores:

DR. FRANCISCO DASÍ FERNÁNDEZ

DRA. AMPARO ESCRIBANO MONTANER

DR. MIGUEL ARMENGOT CARCELLER

Valencia, julio 2018

D. Francisco Dasí Fernández, Profesor Asociado del Departamento. de Fisiología de la Universitat de València.

Dña. Amparo Escribano Montaner, Profesora Titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universitat de València.

D. Miguel Armengot Carceller, Profesor Titular del Departamento de Cirugía de la Universitat de València.

CERTIFICA/N:

Que la presente memoria, titulada “**Estudio del estrés oxidativo en el epitelio nasal ciliado de pacientes con Discinesia Ciliar Primaria**”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D/Dña. **Ana Reula Martín**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 15 de octubre de 2018.

Fdo.: Francisco Dasí
Director/a

Fdo.: Amparo Escribano
Director/a

Fdo.: Miguel Armengot
Director/a

*“LA HISTORIA DE LAS CIENCIAS NOS DEMUESTRA QUE LAS TEORÍAS
SON PERECEDERAS. CON CADA NUEVA VERDAD REVELADA,
TENEMOS UNA MEJOR COMPRENSIÓN DE LA NATURALEZA
Y NUESTRAS CONCEPCIONES Y NUESTROS PUNTOS DE VISTA,
SE MODIFICAN”*

NIKOLA TESLA

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis no habría sido posible sin la participación de un grupo de personas a las cuales quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

En primer lugar, a mis directores, el Dr. Francisco Dasí, la Dra. Amparo Escribano, y el Dr. Miguel Armengot por guiarme a lo largo de estos tres años. Su apoyo y confianza en mi trabajo ha sido clave en mi formación como investigadora. Les agradezco también el haberme enseñado la importancia de trabajar en un equipo multidisciplinar.

También quiero agradecer a los pacientes de Discinesia Ciliar Primaria, a sus familiares, a todos los voluntarios sanos por su participación en este estudio y a Silvia, Teresa, Amparo y Miguel por animarlos a participar en él, sin ellos no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

Agradecer a la Dra. Jane Lucas por acogerme en su laboratorio durante mi estancia internacional en The National Institute for Health Research (NIHR) Southampton Respiratory Biomedical Research en Inglaterra, así como a Claire, Janice y James por enseñarme tanto a lo largo del tiempo que estuve allí.

A las personas que forman o han formado parte del Grupo de Investigación en Enfermedades Raras Respiratorias. Mer, Irene,

Shirley, Dani, María, Lucía, muchas gracias por los buenos momentos vividos. Y en especial a Sara, Silvia y Paquito, que me habéis aguantado dentro y fuera del laboratorio.

A Ester, Guadalupe, Ana Cris y Bea, por ser un apoyo muy importante a lo largo de esta tesis. A Joaquín, pues sin su ayuda este trabajo un hubiese sido lo mismo

Además, este trabajo hubiese sido mucho más difícil sin el apoyo recibido fuera del laboratorio. Así que gracias a todos mis amigos, amigas y familiares que han estado escuchando mis penas y alegrías durante este tiempo.

Y por supuesto, gracias a mis padres y mi hermano por todo lo que han hecho por mí. Gracias por no dejarme decaer en los peores momentos. Y gracias a ti, Javi, por entender mis largas horas, días y meses trabajando. Gracias a los cuatro por confiar en mí más que yo misma, sin vosotros nunca hubiese llegado hasta aquí.

RESUMEN

Antecedentes: La Discinesia Ciliar Primaria (DCP) es una enfermedad rara con una prevalencia estimada de 1:20.000 nacidos vivos. Se caracteriza por una alteración en el patrón de motilidad de los cilios y flagelos que al provocar un déficit en el aclaramiento mucociliar, causa infecciones e inflamación crónica de las vías aéreas. Un proceso inflamatorio ineficiente aumenta la producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN), lo que incrementa el riesgo de padecer distintas enfermedades. En la DCP se ha demostrado que el estrés oxidativo está aumentado en el condensado de aire exhalado de pacientes pediátricos pero, hasta el momento, nunca se había determinado en el tejido afectado. Nuestra hipótesis de partida fue que los pacientes con DCP tienen un estado pro-oxidativo en las células del epitelio respiratorio.

Objetivos: Estudiar el estado oxidativo de las células del epitelio nasal de pacientes con DCP, compararlo con el de voluntarios sanos, y determinar el papel que juega en la fisiopatología de la enfermedad.

Métodos: Se midieron los niveles de ERO, RNS, glutatión reducido (GSH), calcio intracelular (Ca^{2+}), potencial de membrana plasmático, y daño oxidativo en lípidos y proteínas. Además, se analizó la función mitocondrial y la apoptosis de las

células del epitelio nasal de los sujetos de estudio mediante citometría de flujo. En el estudio participaron 2 grupos: 35 voluntarios sanos y 35 pacientes diagnosticados de DCP.

Resultados: Los pacientes con DCP tienen niveles de apoptosis, NO, ONOO⁻, O₂⁻ total, H₂O₂ mitocondrial y O₂⁻ mitocondrial, en las células del epitelio nasal, inferiores a los de los individuos sanos. No existen diferencias en el resto de parámetros medidos, entre pacientes y controles. En el grupo de pacientes tampoco se aprecian diferencias en ninguno de los parámetros comparados ni entre adultos y niños, ni en función del patrón de movilidad ciliar; las mujeres con DCP tienen menores niveles de H₂O₂ y O₂⁻ mitocondriales que los varones con la enfermedad; los pacientes con atelectasias o con *situs inversus*, tienen niveles peróxidos intracelulares superiores a los de los pacientes que no presentan estas anomalías; y aquellos con rinosinusitis crónica tienen niveles más bajos de ONOO⁻ que los que no la tienen. No se han encontrado diferencias en los demás síntomas. Se ha diseñado también un árbol de clasificación de los individuos como “paciente” o “control sano” en función de los niveles de ciertos parámetros del perfil oxidativo medidos en sus células del epitelio nasal.

ABSTRACT

Background: Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a rare disease with an estimated prevalence of 1:20.000 births. It is characterized by an alteration of the mobility pattern of cilia and flagella, causing lack of mucociliary clearance and subsequent infection and chronic inflammation of the airways. An inefficient inflammatory process increases the production of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS), which derives in a higher risk of diseases. In PCD, a study demonstrated that oxidative stress is increased in exhaled breath condensate from paediatric patients. Although oxidative stress had not been determined in the affected tissue yet, we hypothesized that patients with PCD have a pro-oxidative status in respiratory epithelial cells.

Aims: To study the oxidative status of nasal epithelial cells from patients with PCD, compare it with healthy controls, and determine their role on the disease pathophysiology.

Methods: Levels of ROS, RNS, glutathione (GSH), intracellular Ca^{2+} , plasma membrane potential, and oxidative damage in lipids and proteins were measured. In addition, apoptosis and the mitochondrial function were analysed by flow cytometry in nasal epithelial cells. Two groups took part in the study: 35 healthy subjects and 35 patients diagnosed of PCD.

Results: Patients with PCD have levels of apoptosis, NO, ONOO⁻, total O₂⁻, mitochondrial H₂O₂ and mitochondrial O₂⁻ in their nasal epithelial cells lower than those of healthy individuals. There are no differences between the groups of patients and controls in the rest of the parameters measured. When comparing within the group of patients, there are no differences between adults and children in any compared parameter, nor is there any difference depending on the different ciliary mobility pattern; women with PCD have lower levels of mitochondrial H₂O₂ and O₂⁻ than men with the disease; patients with atelectasis, and those with *situs inversus* have higher intracellular peroxides levels than those who do not; patients with chronic rhinosinusitis have lower levels of ONOO⁻ than those who do not, and no differences have been found depending on the other symptoms. A tree has been designed to classify individuals as patient or healthy control based on the levels of certain parameters of the oxidative profile measured in their nasal epithelial cells.

ABREVIATURAS

| | |
|------------------------------|---|
| ·O ₂ ⁻ | Anión superóxido |
| 8OHdG | 8-hidroxideoxiguanosina |
| ADN | Ácido dexosirribonucleico |
| AUC | Área bajo la curva |
| B665 | BODIPY 665/676 C 11 |
| BED | Brazos Externos de Dineína |
| BID | Brazos Internos de Dineína |
| cAMP | <i>Cyclic adenosine monophosphate</i> |
| cGMP | <i>Cyclic guanosine monophosphate</i> |
| CART | Árboles de clasificación y regresión |
| CAT | Catalasa |
| CMFDA | 5-clorometil fluorescein diacetato |
| DAF-FM DA | 4-Amino-5-Metilamino-2'7'-Difluorescein Diacetato |
| DAPI | 4', 6'-Diamidino-2-fenilindol dihidroclorido |
| DCF | 2'7'-diclorodihidrofluoresceína |
| DCP | Discinesia Ciliar Primaria |
| DCS | Discinesia Ciliar Secundaria |
| DEM | Dietil maleato |
| DHR1,2,3 | Dihidrorodamina 1,2,3 |
| DIBAC | Bis-(Ácido Dibutilbarbitúrico) Trimetín Oxonol |
| DO | Daño oxidativo |
| EO | Estrés oxidativo |
| ER | Enfermedad Rara |
| ERN | Especies Reactivas de Nitrógeno |
| ERO | Especies Reactivas de Oxígeno |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorting |
| FCCP | Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona |
| FEV1 | Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo |
| FQ | Fibrosis Quística |
| FSC | Forward scatter |
| FTC | Fluorescein 5-tiosemicarbacida |
| GPx | Glutación peroxidasa |
| GRx | Glutación reductasa |
| GSH | Glutación reducido |

| | |
|-------------------------------|--|
| GSSG | Glutati3n oxidado |
| H ₀ | Hip3tesis nula |
| H ₂ O ₂ | Per3xido de hidr3geno |
| H _A | Hip3tesis alternativa |
| HCUV | Hospital Cl3nico Universitario de Valencia |
| HE | Dihidroetidina |
| HGUV | Hospital General Universitario de Valencia |
| IL | Interleuquina |
| IMC | 3ndice de Masa Corporal |
| LT | Leucotrieno |
| ME | Microscop3a Electr3nica |
| MET | Microscop3a Electr3nica de Transmisi3n |
| MitoPY 1 | Mitocondria Peroxy Yellow 1 |
| MitoSOX | MitoSOXTM Red |
| MT | Microt3bulos |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucle3tido fosfato reducido |
| nNO | 3xido N3trico nasal |
| NO | 3xido N3trico |
| NO ₂ ⁻ | Di3xido de nitr3geno |
| OH ⁻ | Radical hidroxilo |
| ONOO ⁻ | Peroxinitrito |
| ORL | Otorrinolaringolog3a |
| PI | Yoduro de Propidio |
| PMM | Potencial de membrana mitocondrial |
| PMP | Potencial de membrana plasm3tico |
| ppb | Partes por bill3n |
| RO ⁻ | Radical alcoxil |
| ROC | Caracter3stica Operativa del Receptor |
| ROO ⁻ | Radical peroxil |
| SOD | Super3xido dismutasa |
| SSC | Side scatter |
| t-BHP | Hidroper3xido Tert-butil |
| TMRM | Tetrametilrodamina |
| uaf | Unidades de fluorescencia arbitrarias |
| ΔΨ _m | Potencial de membrana mitocondrial |

ÍNDICE

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | INTRODUCCIÓN: DISCINESIA CILIAR | |
| | PRIMARIA | 19 |
| | 1.1. Estructura y función ciliar | 20 |
| | 1.2. Historia de la enfermedad | 22 |
| | 1.3. Síndrome de DCP en el contexto de enfermedades raras | 24 |
| | 1.4. Manifestaciones clínicas de la DCP | 26 |
| | 1.5. Métodos diagnósticos | 29 |
| | 1.5.1. Óxido nítrico nasal..... | 32 |
| | 1.5.2. Estudio del patrón y frecuencia del batido ciliar | 32 |
| | 1.5.3. Microscopía electrónica de transmisión | 33 |
| | 1.5.4. Genética | 34 |
| | 1.5.5. Cultivo de células en interfaz aire-líquido.... | 35 |
| | 1.5.6. Inmunofluorescencia..... | 35 |
| | 1.6. Genética en la DCP | 36 |
| | 1.7. Tratamiento de la DCP | 41 |
| | 1.8. Pronóstico y evolución de la DCP ... | 43 |
| 2. | INTRODUCCIÓN: ESTRÉS OXIDATIVO | 45 |
| | 2.1. Producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno | 46 |
| | 2.2. Sistema de defensa antioxidante | 49 |

| | | |
|--------|--|-----------|
| 2.3. | Desequilibrio del sistema oxidante-antioxidante | 53 |
| 2.4. | Relación entre estrés oxidativo y enfermedad | 58 |
| 3. | JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS. | 63 |
| 3.1. | Justificación del estudio | 64 |
| 3.2. | Hipótesis | 66 |
| 3.3. | Objetivos | 66 |
| 4. | MATERIAL Y MÉTODOS | 69 |
| 4.1. | Pacientes | 70 |
| 4.1.1. | Aspectos éticos | 70 |
| 4.1.2. | Anamnesis y evaluación general | 71 |
| 4.1.3. | Población de estudio | 72 |
| 4.1.4. | Cálculo del tamaño muestral | 73 |
| 4.2. | Determinación del perfil oxidativo mediante citometría de flujo | 73 |
| 4.2.1. | Principios de la citometría de flujo | 73 |
| 4.2.2. | Toma de muestras | 76 |
| 4.2.3. | Reactivos | 77 |
| 4.2.4. | Marcaje fluorescente | 82 |
| 4.2.5. | Configuración de los citómetros y análisis de datos | 91 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 4.3. | Puesta a punto del análisis del perfil oxidativo mediante citometría de flujo | 92 |
| 4.3.1. | Función mitocondrial | 93 |
| 4.3.2. | Generación de ERO y ERN | 94 |
| 4.3.3. | Detección de GSH..... | 98 |
| 4.3.4. | Detección del potencial de membrana plasmático y los niveles de Ca^{2+} intracelular | 99 |
| 4.3.5. | Análisis del daño oxidativo sobre proteínas y lípidos | 101 |
| 4.3.6. | Detección de los niveles de apoptosis y muerte celular | 103 |
| 4.4. | Análisis estadístico | 104 |
| 4.4.1. | Comparación de variables categóricas. | 104 |
| 4.4.2. | Comparación de las medias de dos poblaciones | 105 |
| 4.4.3. | Comparación de más de dos medias: comparaciones múltiples..... | 107 |
| 4.4.4. | Correlación entre dos variables continuas. | 108 |
| 4.4.5. | Árboles de clasificación o decisión..... | 109 |
| 5. | RESULTADOS | 115 |
| 5.1. | Pacientes | 116 |
| 5.2. | Comparación del perfil oxidativo de las células del epitelio respiratorio nasal entre pacientes y controles | 121 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 5.2.1. | Detección de los niveles de apoptosis y muerte celular | 123 |
| 5.2.2. | Medida del potencial de membrana plasmático y de los niveles de Ca^{2+} intracelular | 124 |
| 5.2.3. | Generación de ERO y ERN | 126 |
| 5.2.4. | Función mitocondrial | 130 |
| 5.2.5. | Detección de GSH..... | 134 |
| 5.2.6. | Análisis del daño oxidativo sobre proteínas y lípidos | 135 |
| 5.3. | Comparación del perfil oxidativo de las células del epitelio respiratorio nasal entre pacientes adultos y niños | 137 |
| 5.4. | Comparación del perfil oxidativo de las células del epitelio nasal entre hombres y mujeres con DCP | 139 |
| 5.5. | Comparación del perfil oxidativo de las células del epitelio nasal en pacientes con DCP, según su movilidad ciliar | 143 |
| 5.6. | Comparación del perfil oxidativo de las células del epitelio nasal en pacientes con DCP, según su sintomatología..... | 146 |
| 5.6.1. | Otitis recurrentes | 147 |
| 5.6.2. | Asma | 148 |
| 5.6.3. | Neumonías de repetición..... | 149 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 5.6.4. | Atelectasias | 150 |
| 5.6.5. | Bronquiectasias | 152 |
| 5.6.6. | Rinosinusitis crónica..... | 153 |
| 5.6.7. | Situs inversus..... | 155 |
| 5.7. | Análisis de la correlación entre las variables cuantitativas estudiadas en el grupo de pacientes con DCP | 157 |
| 5.8. | Árbol de clasificación como pacientes o controles según los parámetros de estrés oxidativo | 159 |
| 6. | DISCUSIÓN..... | 165 |
| 6.1. | Consideraciones generales de la muestra | 166 |
| 6.2. | Relación del estrés oxidativo con la DCP.. | 171 |
| 6.3. | Limitaciones del estudio | 178 |
| 7. | CONCLUSIONES..... | 181 |
| 8. | CONCLUSIONS | 185 |
| 9. | BIBLIOGRAFÍA | 189 |
| 10. | TRABAJOS DERIVADOS | 213 |
| 10.1. | Comunicaciones científicas | 214 |
| 10.2. | Proyectos de investigación financiados ... | 216 |
| 10.3. | Premios recibidos | 217 |
| 11. | ANEXOS | 219 |
| 11.1. | Anexo 1 | 220 |
| 11.2. | Anexo 2 | 221 |
| 11.3. | Anexo 3 | 222 |

| | | |
|--------------|----------------------|------------|
| 11.4. | Anexo 4 | 226 |
| 11.5. | Anexo 5 | 227 |
| 11.5 | Anexo 6 | 228 |

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

| | |
|---|-----------|
| Ilustración 1. Representación esquemática de la sección transversal de un cilio móvil..... | 21 |
| Ilustración 2. Guía de la ERS 2017 Task Force para el diagnóstico de la DCP | 31 |
| Ilustración 3. Fuentes de producción de ERO y ERN en la célula..... | 48 |
| Ilustración 4. Esquema de producción de ERO y ERN, que incluye los tipos de especies reactivas, los orgánulos en los que se producen, y la función a nivel celular que desempeñan..... | 50 |
| Ilustración 5. Metabolismo del estrés oxidativo. Esquema de los mecanismos de defensa enzimáticos antioxidantes en células eucariotas | 52 |
| Ilustración 6. Balance entre agentes pro-oxidantes y antioxidantes | 54 |
| Ilustración 7. Efecto del estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante | 57 |
| Ilustración 8. Efecto del estrés oxidativo en el cuerpo humano..... | 59 |
| Ilustración 9. Representación esquemática de los elementos que componen un citómetro de flujo | 76 |
| Ilustración 10. 10A) Cinética de generación de NO, en la que se ven los dos puntos en los que se ha parado la adquisición para añadir las dos dosis de NOR-1, inductor de NO. 10B) Tabla en la que se muestran los porcentajes de <i>gating</i> , y los niveles de fluorescencia para el DAF..... | 96 |
| Ilustración 11. 11A) Cinética de generación de ONOO ⁻ , en la que se ven los dos puntos en los que se ha parado la adquisición para añadir la PB, dador de O ₂ ⁻ , y el NOR-1, inductor de NO. 11B) Tabla en la que se muestran los porcentajes de <i>gating</i> , y los niveles de fluorescencia para la DHR123 (indicadores de niveles de ONOO ⁻), que aumentan con el paso del tiempo..... | 98 |

| | |
|--|------------|
| Ilustración 12. Tabla en la que se muestran los porcentajes de <i>gating</i> , y los niveles de fluorescencia para el Ca ²⁺ intracelular, que aumentan con el paso del tiempo por la acción del ionóforo. | 100 |
| Ilustración 13. <i>Gating</i> para las poblaciones de Anexina V-/PI- (vivas), Anexina V+/PI- (apoptosis temprana), Anexina V-/PI+ (necrosis), Anexina V+/PI+ (apoptosis tardía)..... | 103 |
| Ilustración 14. Ejemplo de árbol de decisión | 111 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|------------|
| Figura 1. Estrategia de <i>gating</i> utilizada para seleccionar la población de interés en el citómetro FACS Verse..... | 93 |
| Figura 2. Estrategia de <i>gating</i> utilizada para seleccionar la población de interés en el citómetro FACS Aria. | 102 |
| Figura 3. El primer gráfico (3a), es un diagrama de barras que muestra el número de mujeres y hombres incluidos en el grupo de pacientes y en el de controles. El segundo (3b) es un diagrama de cajas que muestra la mediana, Q1, Q3, máximos y mínimos de las edades de los pacientes y controles incluidos en el estudio. | 117 |
| Figura 4. Diagrama de dispersión que muestra los valores de media y desviación típica (SD) de los niveles de nNO (en ppb) en el grupo de pacientes.. | 119 |
| Figura 5. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los porcentajes de células vivas en las muestras de pacientes y controles..... | 123 |
| Figura 6. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los porcentajes de células apoptóticas en las muestras de pacientes y controles..... | 124 |
| Figura 7. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para FLUO-4 en las muestras de pacientes y controles..... | 125 |
| Figura 8. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el DIBAC en las muestras de pacientes y controles..... | 126 |
| Figura 9. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el DAF en las muestras de pacientes y controles..... | 127 |

| | |
|--|------------|
| Figura 10. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el DCF en las muestras de pacientes y controles..... | 128 |
| Figura 11. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el HE en las muestras de pacientes y controles..... | 129 |
| Figura 12. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para la DHR123, en las muestras de pacientes y controles..... | 130 |
| Figura 13. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el Mitotracker Green en las muestras de pacientes y controles..... | 131 |
| Figura 14. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el TMRM en las muestras de pacientes y controles..... | 132 |
| Figura 15. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el MitoSOX en las muestras de pacientes y controles..... | 133 |
| Figura 16. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el MitoSOX en las muestras de pacientes y controles..... | 134 |
| Figura 17. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el CMF en las muestras de pacientes y controles..... | 135 |
| Figura 18. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el FTC en las muestras de pacientes y controles..... | 136 |

| | |
|---|------------|
| Figura 19. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el B665 en las muestras de pacientes y controles..... | 137 |
| Figura 20. Gráfica de barras que muestra la mediana y rango intercuartílico de los valores de fluorescencia para el MitoPY, en hombres y mujeres con DCP. | 141 |
| Figura 21. Gráfica de barras que muestra la mediana y rango intercuartílico de los valores de fluorescencia para el MitoSOX en hombres y mujeres con DCP. | 142 |
| Figura 22. Gráficas de barras que muestran la media y desviación típica de los valores de fluorescencia para el DCF, DAF, HE, DHR123, MitoSOX, Mitotracker Green y MitoPY, y porcentaje de células positivas para la Anexina V, en pacientes con DCP según su movilidad ciliar. | 145 |
| Figura 23. Gráfica de barras que muestra la mediana y rango intercuartílico de los valores de fluorescencia para el DCF, en pacientes con DCP que presentan -o no- atelectasias | 151 |
| Figura 24. Gráfica de barras que muestra la mediana y rango intercuartílico de los valores de fluorescencia para la DHR123 en pacientes con DCP que presentan, o no, rinosinusitis..... | 154 |
| Figura 25. Gráfica de barras que muestra la mediana y rango intercuartílico de los valores de fluorescencia para el DCF, en pacientes con DCP que presentan -o no- <i>situs inversus</i> | 156 |
| Figura 26. Árbol de decisión tipo CART para la clasificación de los individuos en grupos de pacientes o controles usando, como criterios clasificatorios, ciertas variables del perfil oxidativo de sus células epiteliales..... | 161 |
| Figura 27. Curva ROC para la determinación de la sensibilidad, especificidad y exactitud diagnóstica del árbol de decisión. | 164 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|------------|
| Tabla 1. Manifestaciones clínicas DCP en los distintos órganos | 27 |
| Tabla 2. Genes responsables de la DCP | 38 |
| Tabla 3. Tabla resumen de los protocolos de citometría basales. | 83 |
| Tabla 4. Tabla resumen de los protocolos de citometría para los controles positivos de cada marcaje. | 86 |
| Tabla 5. Tabla que muestra un ejemplo de los marcajes basales y los controles positivos para cada parámetro mitocondrial medido..... | 94 |
| Tabla 6. Tabla que muestra un ejemplo de los marcajes basales y los controles positivos para los peróxidos intracelulares y el O ₂ ⁻ total..... | 95 |
| Tabla 7. Tabla que muestra un ejemplo de los marcajes basales y los controles positivos para los niveles de GSH (en este caso se ha utilizado DEM, un deplecionador de GSH). | 99 |
| Tabla 8. Tabla que muestra un ejemplo de los marcajes basales y los controles positivos para los niveles de potencial de membrana plasmático (PMP). | 101 |
| Tabla 9. Tabla que muestra un ejemplo de los marcajes basales y los controles positivos para los niveles de proteínas carboniladas..... | 101 |
| Tabla 10. Tabla que muestra un ejemplo de los marcajes basales y los controles positivos para los niveles de peroxidación lipídica.. | 102 |
| Tabla 11. Datos demográficos de los grupos de pacientes y controles. | 116 |
| Tabla 12. Tabla que muestra los datos recogidos de los pacientes.. | 118 |
| Tabla 13. Tabla que muestra el número de pacientes (y porcentaje sobre el total de los 22 en los que se cuenta con ultraestructura), que presentan defectos en la ultraestructura ciliar | 120 |
| Tabla 14. Tabla que muestra el número (y porcentaje) del total de pacientes estudiados con sus distintos patrones y frecuencias de batido ciliar. | 121 |
| Tabla 15. Tabla que incluye las medias y desviaciones típicas de todos los parámetros de estrés oxidativo medidos en el grupo de pacientes y | |

| | |
|---|-----|
| controles, además de cada p-valor de los contrastes de hipótesis para evaluar las diferencias entre ambos grupos.. | 122 |
| Tabla 16. Tabla resumen que incluye las medias y SD de los porcentajes de apoptosis y niveles de fluorescencia, correspondientes a cada parámetro, en pacientes (adultos y niños). | 138 |
| Tabla 17. Tabla resumen que incluye las medias y desviaciones típicas de los porcentajes de apoptosis y niveles de fluorescencia correspondientes a cada parámetro en mujeres y hombres con DCP. | 140 |
| Tabla 18. Tabla resumen que recoge las medias y desviaciones típicas de los porcentajes de apoptosis y niveles de fluorescencia correspondientes a cada parámetro, en pacientes con DCP según su movilidad ciliar.. | 144 |
| Tabla 19. Tabla resumen que muestra las medias y desviaciones típicas de los porcentajes de apoptosis y los niveles de fluorescencia para cada parámetro analizado en pacientes con DCP, con y sin otitis.. | 147 |
| Tabla 20. Tabla resumen que muestra las medias y desviaciones típicas de los porcentajes de apoptosis y los niveles de fluorescencia para cada parámetro analizado en pacientes con DCP, con y sin asma de difícil control.. | 148 |
| Tabla 21. Tabla resumen que muestra las medias y desviaciones típicas de los porcentajes de apoptosis y los niveles de fluorescencia para cada parámetro analizado en pacientes afectados de DCP, con y sin neumonía..... | 149 |
| Tabla 22. Tabla resumen que muestra las medias y desviaciones típicas de los porcentajes de apoptosis y los niveles de fluorescencia para cada parámetro analizado en pacientes con DCP, con y sin atelectasias.. . | 150 |
| Tabla 23. Tabla resumen que muestra las medias y desviaciones típicas de los porcentajes de apoptosis y los niveles de fluorescencia para cada parámetro analizado en pacientes con DCP, con y sin bronquiectasias. | 152 |

Tabla 24. Tabla resumen que muestra las medias y desviaciones típicas de los porcentajes de apoptosis y los niveles de fluorescencia para cada parámetro analizado en pacientes con DCP, con y sin rinosinusitis...**153**

Tabla 25. Tabla resumen que muestra las medias y desviaciones típicas de los porcentajes de apoptosis y los niveles de fluorescencia para cada parámetro analizado en pacientes con DCP, con y sin *situs inversus*. **155**

ÍNDICE DE TABLAS SUPLEMENTARIAS

| | |
|--|------------|
| Tabla suplementaria 1. Tabla de recogida de datos clínicos de los sujetos participantes en el estudio. | 226 |
| Tabla suplementaria 2. Tabla de clasificación de las alteraciones clínicas encontradas en los pacientes en análisis de la ultra estructura y función ciliar, y medida del nNO. | 227 |

1. Introducción: Discinesia Ciliar Primaria

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. Los primeros, inmóviles, son sensores de información y se encuentran en los órganos de la vista, oído, olfato; en las células epiteliales tubulares renales y en la mayoría de las células del cuerpo, en algún momento de su evolución. Los segundos, se localizan en la superficie epitelial del tracto respiratorio, en el epéndimo (el delgado revestimiento neuroepitelial del sistema ventricular del cerebro y el canal central de la médula espinal), y en los órganos reproductores masculino y femenino (conductos eferentes testiculares y Trompas de Falopio)¹. Asimismo, la cola del espermatozoide tiene una estructura ciliar modificada a flagelo.

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 los cilios móviles presenta la organización “9+2” característica: un par central de microtúbulos internos, rodeados

por 9 dobletes de microtúbulos periféricos (Ilustración 1). 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, que se ven como brazos externos e internos de los dobletes².

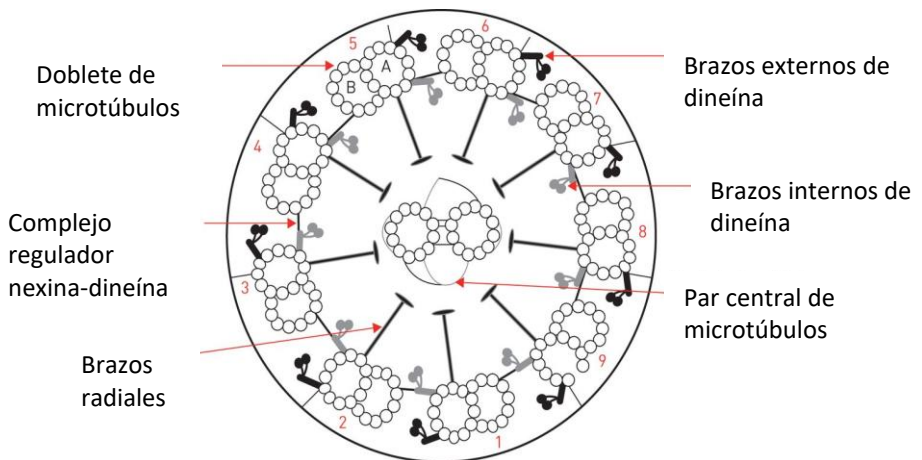


Ilustración 1. Representación esquemática de la sección transversal de un cilio móvil (Modificado de Lucas JS *et al.* Eur Resp J. 2017; 49: 1601090).

Los brazos de dineína están conectados con las ATPasas, que actúan como generadoras de movimiento mediante la hidrólisis de ATP. Así, la dineína está directamente relacionada con la función motora del cilio y son las espinas radiales las que determinan la dirección del movimiento³.

1.2. Historia de la enfermedad

En 1901, Siewert comunicó por primera vez la asociación entre *situs inversus* y bronquiectasias⁴. En 1933, Kartagener describió un grupo de pacientes que tenían bronquiectasias, *situs inversus* y sinusitis⁵. Desde aquel momento, esta tríada pasó a conocerse como “Síndrome de Kartagener”.

En 1975, Afzelius identificó anomalías ultraestructurales en los espermatozoides de un grupo de hombres que presentaban infertilidad, junto a bronquitis crónica y bronquiectasias⁶. Estudios posteriores detectaron alteraciones similares en los cilios de su tracto respiratorio⁷. Dos años después, Elliasson *et al.* publicaron varios casos clínicamente compatibles con un síndrome de Kartagener, con las anomalías ultraestructurales descritas pero sin la presencia de *situs inversus*⁸. Por ello, en 1980, para referirse a estos casos se propone el término “síndrome de los cilios inmóviles”, ya que el *situs inversus* sólo está presente en cerca del 50% de los pacientes con esta enfermedad^{9,10}, dejando la denominación “síndrome de Kartagener” para aquellos pacientes que presenten la tríada completa (sinusitis, bronquiectasias y *situs inversus*).

En 1988, Rossman y Newhouse demostraron que las manifestaciones clínicas podrían deberse al movimiento discinético o ineficiente de los cilios y no sólo a la existencia de cilios totalmente inmóviles. De ésta forma surgió el término “Discinesia Ciliar Primaria” (DCP), que pasó a utilizarse en sustitución del de “Síndrome de los cilios inmóviles”¹¹.

Ya a finales de los años 80, se demostró que el transporte mucociliar podía estar alterado, no sólo como consecuencia de defectos ultraestructurales en los cilios, sino de infecciones bacterianas o virales recurrentes, o por inhalación de sustancias o fármacos que, al alterar la función ciliar, provocan estasis de las secreciones, reproduciendo así un cuadro clínico similar al de la DCP¹². A su vez, las infecciones recurrentes, podrían dar lugar a un proceso inflamatorio crónico en la vía aérea que afectaría la ultraestructura ciliar¹³. De este modo surgió el término “Discinesia Ciliar Secundaria” (DCS), que se utiliza para referirse a alteraciones transitorias en el transporte mucociliar debidas a causas secundarias, mientras que el término DCP se refiere a una condición permanente y hereditaria¹⁴.

1.3. Síndrome de DCP en el contexto de enfermedades raras

Las enfermedades raras (ER) son aquellas que afectan a un número pequeño de personas dentro de la población general. En Europa se considera que una enfermedad es rara cuando afecta a 1 individuo de cada 2.000¹⁵. Según la Organización Mundial de la Salud existen alrededor de 8.000 enfermedades raras, y aunque cada una de ellas afecta a un número reducido de personas, el total de pacientes con enfermedades minoritarias es el 7% de la población mundial (más de 400 millones), de los que 3 millones son españoles¹⁶. La DCP (código de orphanet: ORPHA244), es la segunda afección congénita más común de las vías respiratorias tras la fibrosis quística (FQ), con una prevalencia estimada de 1/20.000, con lo que puede considerarse una enfermedad rara¹⁵.

Se trata de una enfermedad infradiagnosticada y con un evidente retraso diagnóstico, a pesar de que los síntomas aparecen en edades muy tempranas. En Europa, la edad media al diagnóstico es de 5,3 años, y se reduce a los 3,5 años en los pacientes que asocian un *situs inversus*¹⁷. Khueni *et al.*, en 2010,

aprecian que existe correlación entre la precocidad diagnóstica y una mayor inversión gubernamental en salud, de modo que mientras la edad media diagnóstica en las Islas Británicas es de 4,8 años, en el Oeste y Norte de Europa y en el Este y Sur de Europa, es de 5 y 5,5 y de 6,8 y 6,5 años respectivamente¹⁸.

Este estudio, realizado por la *European Respiratory Society Task Force*, en el que participaron un total de 223 centros de 26 países europeos y se recogieron más de 1.000 pacientes diagnosticados de DCP antes de los 20 años de edad, concluye que la prevalencia de la enfermedad es muy variable entre los distintos países. Así, en Chipre se daba la frecuencia más alta (111 casos por millón de habitantes entre los 5-14 años, lo que equivale a 1/10.000); Dinamarca o Suiza tenían una prevalencia de 1/20.000, y España de 20,5 casos por millón de habitantes (1/30.000 niños)¹⁸. Estos datos, aunque extraídos de diagnósticos no corroborados de forma homogénea, sugieren la existencia de diagnósticos inadecuados o/y de un infradiagnóstico en nuestro país.

1.4. Manifestaciones clínicas de la DCP

La DCP es una enfermedad genética que se caracteriza por un movimiento anómalo de los cilios móviles y de los flagelos. Como consecuencia, se produce un deterioro en el aclaramiento de las secreciones y *detritus* en las vías aéreas superiores e inferiores. La estasis de las secreciones mucosas favorece el desarrollo de infecciones respiratorias crónicas y condiciona los síntomas propios de la enfermedad que, aunque son evidentes desde el nacimiento, al tratarse de manifestaciones clínicas bastante comunes en la infancia (rinitis, otitis media secretora, tos, y bronquitis recurrentes...), no suelen ser atribuidos por el pediatra a una determinada enfermedad subyacente, lo que justifica el retraso diagnóstico^{18,19}. Sin embargo, lo característico en la DCP, es que esta sintomatología es reiterada o crónica y tiene una expresión multisistémica, puesto que afecta a todos los órganos en los que los cilios ejercen su función (Tabla 1).

Globalmente, la expresión clínica de la DCP se asemeja a otras enfermedades, como la FQ, inmunodeficiencias, infecciones causadas por *Aspergillus* o *M. tuberculosis*, reflujo gastroesofágico crónico con aspiraciones o déficit de alfa-1 antitripsina, pudiéndose confundir con ellas²⁰. Por ello, dado que

muchas disponen de test diagnósticos asequibles y concluyentes, podrían realizarse antes de plantear las pruebas específicas de la DCP, mucho más complicadas y no siempre disponibles.

Tabla 1. Manifestaciones clínicas DCP en los distintos órganos (Adaptada de Reula *et al.* Expert Opinion on Orphan Drugs, 2017; 5:537-548)

| Órgano afectado | Síntomas |
|---------------------------------|---|
| Pulmón | Distrés respiratorio neonatal Infecciones recurrentes Bronquiectasias |
| Oído | Otitis media secretora Otitis media crónica Hipoacusia de transmisión |
| Senos paranasales | Sinusitis crónica Hipoplasia de senos, especialmente del frontal |
| Tracto genito-urinario | Infertilidad en varones Fertilidad reducida en mujeres |
| Lateralidad | <i>Situs inversus</i> <i>Situs ambiguous</i> (Heterotaxia) |
| Otros (muy infrecuentes) | Hidrocefalia Retinosis pigmentaria Riñón poliquístico |

Los síntomas pueden estar presentes desde el período neonatal ya que, entre el 75-85% de los pacientes con DCP debuta con un distrés respiratorio de causa no filiada²¹. Otra de las

manifestaciones precoces de la enfermedad , que podría ya detectarse en una ecografía gestacional, es la ventriculomegalia cerebral fetal leve, que puede ser debida a una disfunción en los cilios endimarios²². Posteriormente, a lo largo de la vida, esta alteración ciliar podría dar lugar en algunos pacientes, a una hidrocefalia, aunque son casos muy raros.

Durante la infancia y adolescencia, las manifestaciones habituales son la tos crónica productiva, la rinorrea persistente y las otitis serosas que, aunque pueden mejorar con tratamiento antibiótico o con el cambio estacional, nunca llegan a desaparecer^{23,24}. Además, con la edad, como consecuencia de las infecciones crónicas y recurrentes, se produce un lento deterioro de la función pulmonar de grado variable, desde leve a grave^{25,26} y un daño estructural irreversible, con bronquiectasias que, aunque pueden estar presentes ya en la infancia van a afectar a la mayor parte de los pacientes en la etapa adulta²⁷.

En lo referente a los problemas auditivos, generalmente mejoran con la edad, aunque algunos pacientes con DCP pueden presentar hipoacusia de transmisión permanente. Además, es bastante frecuente la hipoplasia de los senos paranasales, y especialmente, la aplasia de los senos frontales²⁸.

La discinesia de los cilios nodales embrionarios puede provocar también una distribución al azar de los órganos corporales y da lugar, en el 40-55% de los casos, a un *situs inversus* o en el 6-12%, a un *situs ambiguous* (heterotaxia) que puede ir asociado a defectos cardíacos^{29,30,31}.

Puesto que la DCP también afecta a los espermatozoides y a los cilios móviles de las trompas de Falopio, los pacientes con esta enfermedad presentan problemas de fertilidad. Algunos varones tienen espermatozoides vivos pero inmóviles. En el caso de las mujeres, la afectación de los cilios de las células de las trompas de Falopio provoca retraso en el transporte de los óvulos y, consecuentemente, reducción de la fertilidad. También se han reportado casos de embarazos ectópicos, pero no está claro si son más comunes que en la población general^{32,33}. Sin embargo, no todos los pacientes con DCP son infértiles, necesitando contar con más estudios para conocer la prevalencia real de estos problemas^{34,35}.

1.5. Métodos diagnósticos

Hasta la fecha, no existe una técnica *Gold Standard* para el diagnóstico de la DCP. Por ello, en la mayor parte de los casos es necesaria la combinación de distintos tests para llegar a un

diagnóstico definitivo. Recientemente, la *European Respiratory Society Task Force* publicó una guía en la que se establecen los pasos a dar para diagnosticar o excluir definitivamente a un paciente³⁶ (Ilustración 2).

El primer paso para iniciar un proceso diagnóstico es identificar a los pacientes con una historia clínica compatible con la enfermedad. Hay dos estudios que proponen la aplicación de puntuaciones clínicas para establecer la sospecha diagnóstica^{37,38}. El primero, “score PICADAR”, se desarrolló usando los datos clínicos de más de 600 pacientes referidos a centros diagnósticos de DCP. Utiliza un modelo de regresión para identificar 7 síntomas, suficientemente predictivos como para ser utilizados como herramienta clínica³⁸.

El segundo utiliza un *score* predictivo basado en 4 síntomas³⁷. En base a unos puntos de corte estadísticamente determinados se establece qué paciente es susceptible de padecer DCP, debiendo remitirlo en ese caso, a un centro especializado para el diagnóstico, en donde se podrían utilizar pruebas de *screening* (orientadoras, pero no definitivas) o/y pruebas específicas/corroboradoras de la enfermedad.

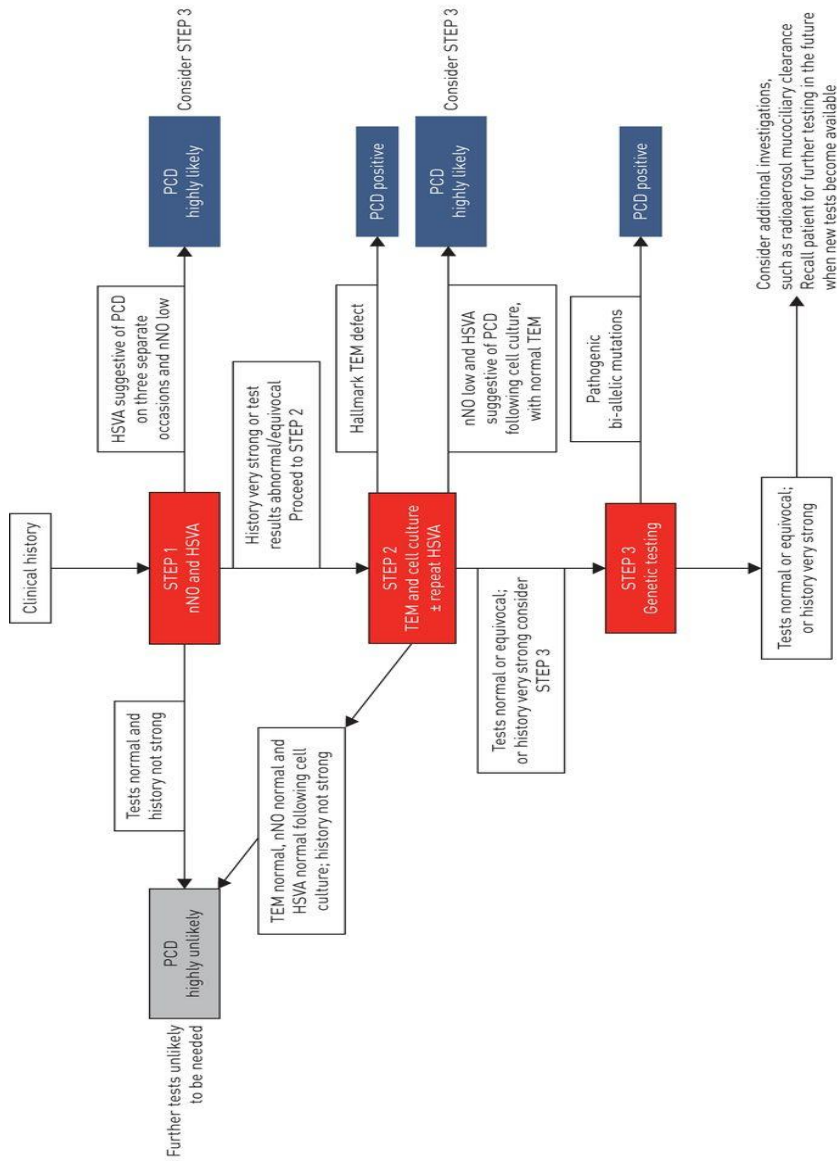


Ilustración 2. Guía de la ERS 2017 Task Force para el diagnóstico de la DCP (Lucas JS *et al.* Eur Resp J. 2017; 49: 1601090).

1.5.1. Óxido nítrico nasal

La medida del óxido nítrico nasal (nNO) se recomienda como test inicial en pacientes con sospecha clínica de DCP^{36,39}, ya que valores bajos de nNO son altamente sugestivos de este diagnóstico y obligarían a remitir de inmediato al paciente para realizar pruebas diagnósticas más concluyentes. Sin embargo, a pesar de su buena sensibilidad, existen casos de DCP con valores normales de nNO, por lo que aunque el nNO sea normal -si la clínica es consistente- no se debería descartar la enfermedad. Por otra parte, algunas patologías, como la FQ, podrían reducir sus valores. Por ello, el nNO no puede usarse como test diagnóstico concluyente debido a la presencia de falsos positivos y falsos negativos³⁶. Además, esta prueba no está bien tipificada en los niños menores de 6 años, en los que es más difícil de realizar, dando con resultados muy variables, por lo que no serviría como test discriminatorio precoz, que es lo que interesa.

1.5.2. Estudio del patrón y frecuencia del batido ciliar

El estudio de la movilidad ciliar mediante vídeo-microscopía de alta velocidad tiene buena sensibilidad y especificidad^{36,40}. Sin embargo, es una prueba de interpretación difícil, que requiere

un equipo sofisticado y debe ser llevada a cabo por personal con experiencia. Mediante esta técnica puede ser muy complicado en algunos casos, diferenciar una DCP de una DCS; en ellos, repetir la prueba tras cultivar las células de los pacientes en una interfaz aire-líquido puede ayudar a diferenciarlas^{36,41}.

1.5.3. Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (MET) permite el estudio del axonema ciliar y la detección de las alteraciones estructurales que condicionarían los déficits de función. Los defectos ultraestructurales más frecuentes que causan anomalías en el movimiento de los cilios son:

- Defecto en los brazos externos de dineína (BED) (25-50% casos)
- Combinación de defectos en los BED y en los brazos internos de dineína (BID) (25-50% casos)
- Defectos en los BID asociados a desorganización de los microtúbulos (15% casos)
- Defectos en el par central de microtúbulos (5-15% casos)^{36,42,43,44}

No obstante, alrededor del 15-20% de los pacientes con DCP presentan una ultraestructura normal detectada por MET, por lo que -aunque esta técnica es concluyente a la hora de confirmar la DCP-, una ultraestructura normal no permite descartar la enfermedad.

1.5.4. Genética

Hasta la fecha, se han descrito mutaciones en 39 genes implicados en la DCP⁴⁵. No obstante, éstas sólo explican alrededor del 65% de los casos. En la actualidad, las guías recomiendan utilizar los test genéticos para estudiar las mutaciones en casos de DCP confirmada por otras pruebas diagnósticas, o en casos de clínica muy robusta, pero de difícil diagnóstico mediante las otras pruebas. No obstante, a medida que se vaya teniendo más conocimiento de las mutaciones implicadas, el genotipado irá adquiriendo importancia sobre otras pruebas diagnósticas.

1.5.5. Cultivo de células en interfaz aire-líquido

Los agentes biológicos o químicos (como virus o bacterias) pueden alterar la actividad ciliar y, en consecuencia, el aclaramiento mucociliar, desencadenando un daño pulmonar. Dado que las infecciones respiratorias son comunes, sobre todo en los niños, y que la propia infección podría dañar el cilio, en algunos casos resulta complicado discriminar entre una DCP y una DCS mediante los distintos test expuestos hasta ahora. Para ello, resulta de gran utilidad el cultivo de células del epitelio nasal ciliado, la repetición de los vídeos de alta velocidad y el análisis mediante MET tras el cultivo ya que, con éste último, se eliminaría la noxa externa como posible factor desencadenante de la alteración de la actividad ciliar. No obstante, ésta técnica, en la actualidad, sólo está disponible en pocos centros diagnósticos.

1.5.6. Inmunofluorescencia

El marcaje inmunofluorescente de proteínas específicas de la estructura ciliar se está convirtiendo en una herramienta potencial para el diagnóstico de la DCP. A pesar de ello, todavía

no existen estudios concluyentes que determinen su papel como test diagnóstico⁴⁶.

1.6. Genética en la DCP

La DCP es un trastorno genéticamente heterogéneo, con una herencia mendeliana autosómica recesiva (con la excepción de dos genes con herencia ligada al cromosoma X que causan DCP síndrónica: RPGC (MIM 312610) y OFD1 (MIM 300170), que combinan respectivamente, la DCP con la retinitis pigmentosa y el síndrome oro-facial-digital; y el gen PIH1D3 (MIM 300933), que produce una DCP no síndrónica). En todos los casos con herencia autosómica recesiva, para que la mutación sea patogénica, ha de estar presente en homocigosis. No hay ningún caso descrito de dos mutaciones en heterocigosis en dos genes distintos implicados en DCP que causen la enfermedad⁴⁵.

En la actualidad hay descritos 39 genes asociados a la DCP (tabla 2). Estas mutaciones explican alrededor del 65% de los casos de pacientes con esta enfermedad. De éstos 39 genes, 10 codifican para proteínas de los BED o de un complejo proteico asociado a los BED: DNAH5 [MIM 603335; prevalencia 15–21%], DNAH11 [MIM603339; prevalencia 6%], CCDC114 [MIM 615038], TTC25 [MIM617095], DNAL1 [MIM 610062], DNAI1 [MIM 604366],

DNAI2 [MIM 605483], NME8 [MIM 607421], ARMC4 [MIM 615408] y CDC151 [MIM 615956]. Las mutaciones en los genes que controlan el complejo de los BED suelen asociarse con fenotipos de cilio inmóvil, ya que los BED controlan el movimiento efectivo de los cilios.

Hay 11 genes que codifican proteínas plasmáticas implicadas en el transporte y ensamblaje de los brazos de dineína en los axonemas: SPAG1 [MIM 603395], DNAAF1 [MIM 613190], DNAAF2 [MIM 612517], DNAAF3 [MIM 614566], HEATR2 [MIM 614864], DYX1C1 [MIM 608706], ZMYND10 [MIM 607070], DNAH1 [MIM 603332], LRRC6 [MIM 614930], CCDC103 [MIM 614677] y C21orf59 [MIM 615494], mutaciones que combinan defectos en los BED y en los BID.

Hay 13 genes con mutaciones puntuales que causan DCP. Se asocian a factores del complejo regulador Nexina-Dineína que incluyen el par central, los brazos radiales, y los microtúbulos del par central: CCDC39 [MIM 613798], CCDC40 [MIM 613799], CCDC65 [MIM 611088], CCDC164 [MIM 615288] y GAS8 [616726]; RSPH1 [MIM 609314], RSPH4A [MIM 612647], RSPH3 [MIN 616481], DNAJB13 [MIM 610263] y RSPH9 [MIM 612648] HYDIN [MIM610812]; o regulan la ciliogénesis: CCNO [MIM 615872] y MCIDAS [MIM 614086], dando lugar a una reducción

en el número de cilios. Más recientemente se han añadido mutaciones en genes que afectan a proteínas reguladoras de la energía, como la adenilato kinasa 7 (AK7).

Tabla 2. Genes responsables de la DCP: +, mutaciones genéticas responsables de <1% de casos de DCP; ++, mutaciones genéticas responsables del 1–4% de casos de DCP; +++, mutaciones genéticas responsables del 4–10% de casos de DCP; +++++, mutaciones genéticas responsables de >15% de casos de DCP; BED, brazos externos de dineína; BID, brazos internos de dineína (Adaptada de Reula *et al.* Expert Opinion on Orphan Drugs, 2017; 5:537-548)

| Genes | Prevalencia | Defecto ultraestructural | Fenotipo | Ref. |
|----------------------|-------------|--------------------------|---------------------------|-------|
| DNAH5 | ++++ | Defecto BED | Cilios inmóviles | 47–49 |
| DNAI1 | +++ | Defecto BED | Cilios inmóviles | 50–54 |
| DNAI2 | ++ | Defecto BED | Cilios inmóviles | 55 |
| DNAL1 | + | Defecto BED | Movilidad ciliar reducida | 56 |
| CCDC114 | ++ | Defecto BED | Cilios inmóviles | 57,58 |
| TTC25 | + | Defecto BED | Cilios inmóviles | 59 |
| CCDC151 | ++ | Defecto BED | Cilios inmóviles | 60,61 |
| ARMC4 | ++ | Defecto BED | Cilios inmóviles | 62,63 |
| CCDC103 | ++ | Defecto BED | Cilios inmóviles | 64 |
| NME8 (TXNDC3) | + | Defecto parcial BED | Cilios inmóviles | 65 |

| | | | | |
|----------------------------|-----|-------------------|--|-------|
| DNAAF1 (LRRC50) | ++ | Defecto BED y BID | Cilios inmóviles | 66,67 |
| DNAAF2 (KTU) | ++ | Defecto BED y BID | Cilios inmóviles | 68 |
| DNAAF3 | + | Defecto BED y BID | Cilios inmóviles | 69 |
| LRRC6 | ++ | Defecto BED y BID | Cilios inmóviles | 70,71 |
| HEATR2 | + | Defecto BED y BID | Cilios inmóviles | 72 |
| DYX1C1 (DNAAF4) | + | Defecto BED y BID | Cilios inmóviles | 73 |
| C21orf59 | + | Defecto BED y BID | | 74 |
| ZMYND10 | ++ | Defecto BED y BID | Cilios inmóviles | 75,76 |
| SPAG1 | ++ | Defecto BED y BID | Cilios inmóviles | 77 |
| DNAH1 | + | Defecto BID | Movilidad ciliar reducida | 78 |
| RPGR | + | Normal | DCP sindrómica, con retinitis pigmentosa | 79,80 |
| OFD1 | + | Normal | DCP sindrómica, con síndrome de orofacia digital | 81 |
| PIHID3 | + | Defecto BED y BID | Cilios mayoritariamente inmóviles | 82 |
| DNAH11 | +++ | Normal | Cilios hiperfrecuentes, con amplitud de batido ciliar reducida | 83,84 |
| HYDIN | + | Normal | Amplitud de batido reducida, descoordinación | 85 |

| | | | | |
|---------------------------|-----|---|------------------------------------|----------|
| CCDC164 (DRC1) | + | Mayoritariamente normal, con defectos en el complejo regulador de dineína | Amplitud de batido ciliar reducida | 86 |
| CCDC65 (DRC2) | + | Mayoritariamente normal | Movilidad reducida | 74 |
| GAS8 | + | Mayoritariamente normal | Amplitud de batido ciliar reducida | 87 |
| CCDC39 | +++ | Defecto en BID y desorganización de microtúbulos | Cilios hiperfrecuentes y rígidos | 88,89 |
| CCDC40 | +++ | Defecto en BID y desorganización de microtúbulos | Cilios hiperfrecuentes y rígidos | 89,90 |
| RSPH9 | + | Desorganización de microtúbulos (defecto en el par central y los brazos radiales) | Batido ciliar circular | 91–93 |
| RSPH4A | ++ | Desorganización de microtúbulos (defecto en el par central y los brazos radiales) | Batido circular o cilios rígidos | 91–93 |
| RSPH1 | ++ | Desorganización de microtúbulos (defecto en el par central y los brazos radiales) | Patrones variados de batido ciliar | 92,94,95 |
| RSPH3 | + | Desorganización de microtúbulos (defecto en el par central y los brazos radiales) | Amplitud de batido reducida | 96 |
| DNAJB13 | + | Porcentaje anormal de cilios sin el par central | Cilios inmóviles | 97 |

| | | | | |
|---------------|---|---------------------------|--------------------------------------|-----|
| CCNO | + | Muy bajo número de cilios | Reducción del número de cilios | 98 |
| MCIDAS | + | Muy bajo número de cilios | Reducción del número de cilios | 99 |
| DNAH8 | + | | | 100 |
| AK7 | + | Normal | Frecuencia de batido ciliar reducida | 101 |

1.7. Tratamiento de la DCP

En la actualidad, no existe un tratamiento específico para la DCP. Las personas afectas se tratan siguiendo las pautas establecidas para otras enfermedades similares, como la FQ y la rinosinusitis.

Existen numerosas opciones terapéuticas que contribuyen a la mejora de la calidad de vida de éstos pacientes y que incluyen la monitorización regular de la función auditiva y respiratoria, fisioterapia para facilitar el aclaramiento de las secreciones de las vías aéreas^{46,102} y la práctica regular de ejercicio físico¹⁰³.

Es importante adaptar los tratamientos con antibióticos a los resultados de los cultivos de esputo, que se llevan a cabo cadencialmente y en las reagudizaciones, para identificar los patógenos implicados.²⁷. Además, en todos los pacientes con

DCP, es muy recomendable la prevención de las infecciones mediante la utilización de vacunas¹⁰³⁻¹⁰⁵.

En casos de afectación pulmonar grave, cuando ya no hay otras opciones, se puede realizar un trasplante de pulmón¹⁰⁶. Además, puesto que los defectos cardíacos son 200 veces más frecuentes en estos enfermos que en la población general¹⁰⁷, antes de una intervención quirúrgica en cualquier paciente con DCP, se debe plantear un plan preoperatorio con un equipo multidisciplinar de cardiólogos, neumólogos e intensivistas.

Por último, al tratarse de una enfermedad hereditaria, en los pacientes que quieren tener hijos, es muy importante el consejo genético. Las inyecciones intracitoplásmicas de espermatozoides pueden facilitar la concepción en el caso de varones con espermatozoides inmóviles³⁵. Además, la fecundación *in vitro* y la implantación intra-uterina del óvulo fecundado, pueden ser de ayuda para mujeres con DCP con fertilidad reducida¹⁰⁸.

1.8. Pronóstico y evolución de la DCP

Los pacientes con DCP tienen una esperanza de vida normal y la tasa de deterioro de la función pulmonar es más lenta que en otras enfermedades de características similares, como la FQ. Por ello, llevando un estilo de vida saludable, evitando el tabaco, realizando ejercicio físico y fisioterapia respiratoria diarios y tratando precozmente las infecciones respiratorias con antibióticos, el pronóstico de la enfermedad puede no ser desfavorable. No obstante, hay pacientes que tienen una peor evolución¹⁰⁹.

Un estudio retrospectivo reciente sobre una población adulta de pacientes con DCP, encuentra que existe una correlación negativa entre la edad en el momento del diagnóstico y el Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo (FEV₁); es decir, los casos diagnosticados en edades más tardías presentan menores niveles de FEV₁ (con una pérdida estimada del 0,49% de la función pulmonar por año). También se comprueba que la edad al diagnóstico se correlaciona positivamente con la infección bronquial por *Pseudomonas aeruginosa*. En el mismo estudio observan que puede existir relación entre el tipo de alteración de la ultraestructura ciliar y la pérdida de función

pulmonar, siendo los pacientes con defectos en los microtúbulos los más afectados. Además observan que la presencia de bronquiectasias y el grado de dilatación de la pared bronquial influyen en la pérdida de FEV₁ con la edad^{110,111}.

El seguimiento de estos pacientes ha de llevarlo a cabo un equipo multidisciplinar que incluya, como mínimo un otorrinolaringólogo, un neumólogo, un enfermero especialista y un fisioterapeuta respiratorio, además de otras especialidades en casos concretos¹⁰⁹.

2. Introducción: Estrés oxidativo

2.1. Producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno

El oxígeno es un elemento imprescindible para la vida, pero solo 95% del consumido sigue la ruta fisiológica. El 5% restante sufre sucesivas reducciones en las que se generan moléculas altamente tóxicas, denominadas especies reactivas de oxígeno (ERO)

Las ERO se producen como consecuencia, tanto del propio metabolismo aerobio celular, como de la exposición a determinados agentes externos (radiaciones ionizantes, luz ultravioleta, contaminación ambiental, algunos medicamentos como los corticoides, y xenobióticos como pesticidas, herbicidas o fungicidas, y humo del tabaco)^{112,113}.

Las ERO son compuestos derivados de la molécula de oxígeno (O_2) por reducción química parcial, que incluyen 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 ($\cdot O_2^-$), que debe su

inestabilidad a la reacción de dismutación del $\cdot\text{O}_2^-$ a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), altamente favorable. El H_2O_2 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)¹¹⁴. A su vez, la interacción de diversos ERO con derivados del nitrógeno puede resultar en la generación de especies reactivas de nitrógeno (ERN), entre las que se encuentra el óxido nítrico (NO), el dióxido de nitrógeno (NO_2^\cdot) y el peroxinitrito (ONOO^\cdot)¹¹⁵.

En los organismos superiores, la producción de ERO y ERN puede tener origen en cualquier compartimento celular (Ilustración 3), 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 O_2 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 ERO¹¹⁶.

Asimismo, cualquier sistema enzimático con capacidad oxidativa puede generar ERO como subproductos de la reacción de transferencia electrónica. Éste es el caso del citocromo p450 (en el retículo endoplásmico), la xantina oxidasa (en los peroxisomas), o la NADPH oxidasa (en las membranas plasmáticas de los leucocitos), entre otras¹¹⁴.

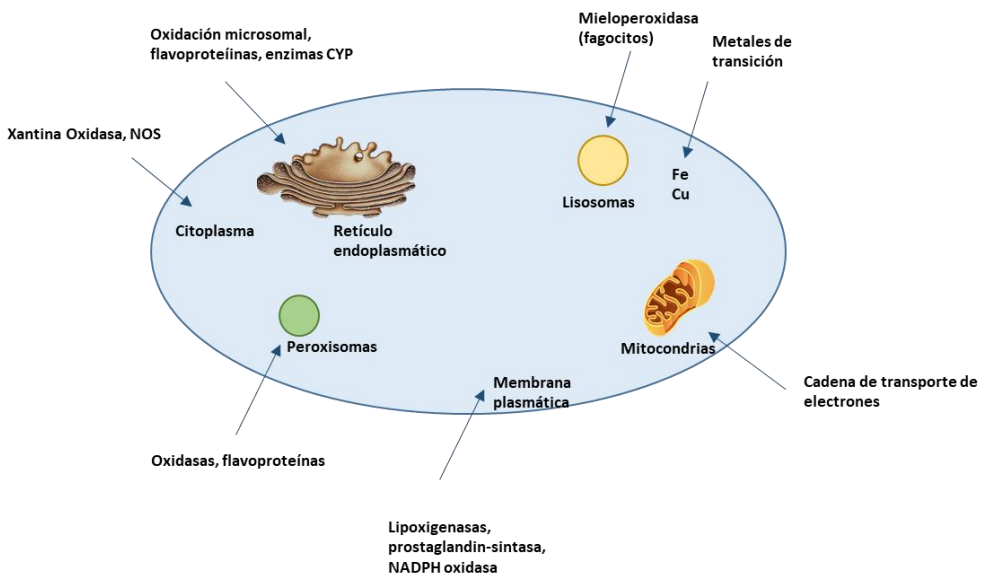


Ilustración 3. Fuentes de producción de ERO y ERN en la célula (Adaptada de Figueira et al. Antioxidants & redox signaling, 2013; 18: 2029-2074).

2.2. Sistema de defensa antioxidante

Las ERO 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 las rutas de transducción de señales, de gran importancia para la comunicación y función de las células (Ilustración 4). No obstante, una producción incontrolada de ERO puede convertirse en fuente de enfermedad, dado que para estabilizarse estas especies dañan las estructuras de las macromoléculas (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), causando alteraciones en los procesos celulares que regulan su fisiología y metabolismo¹¹⁷.

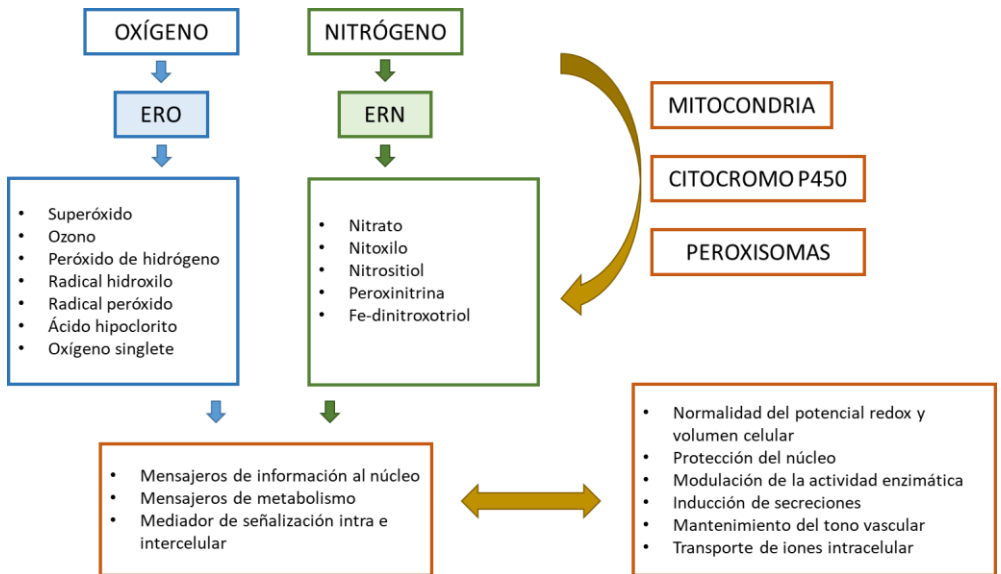


Ilustración 4. Esquema de producción de ERO y ERN, que incluye los tipos de especies reactivas, los orgánulos en los que se producen, y la función a nivel celular que desempeñan (Adaptada de Rahman *et al.* *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2012; 3:997-1019).

Con objeto de prevenir los efectos lesivos de la producción *in vivo* de ERO y ERN, la evolución ha dotado a los organismos eucariotas 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 su oxidación, actuando así como eliminadoras (*scavengers*) y reparadoras del daño producido¹¹⁸.

Entre los sistemas de defensa antioxidantes se incluyen los enzimáticos, que son capaces de metabolizar los ERO (Ilustración 5), como la superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la dismutación de $\cdot\text{O}_2^-$ a H_2O_2 , la catalasa (CAT) y el 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 importante. En el proceso de detoxificación del H_2O_2 , la GPx consume por oxidación el glutatión reducido (GSH), principal molécula antioxidante soluble y éste queda en su forma oxidada (GSSG)¹¹⁹. 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^{120,121,122,123}. Este NADPH es suministrado por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa que media la oxidación de la glucosa-6-fosfato y del 6-fosfogluconato. Ésta es una vía principal del metabolismo de H_2O_2 en muchas células, por lo que es importante en la protección de los lípidos de membrana contra la oxidación.

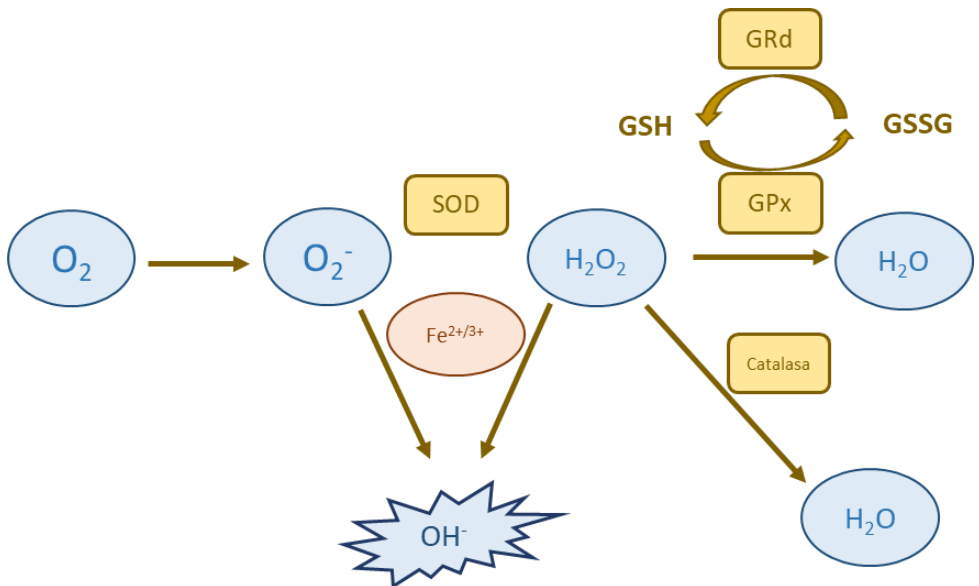


Ilustración 5. Metabolismo del estrés oxidativo. Esquema de los mecanismos de defensa enzimáticos antioxidantes en células eucariotas

A su vez, un extenso conjunto de sustancias químicas producidas de forma endógena conforman la defensa antioxidante de bajo peso molecular no enzimática, constituida por moléculas como el GSH y la coenzima Q10; por proteínas como la transferrina y la ceruloplasmina, y por moléculas exógenas, suministradas en la dieta, como la vitamina E, vitamina C, cofactores (Se, Zn, Mn) y compuestos naturales como carotenoides y flavonoides^{124,123}.

La vitamina C, o ácido ascórbico, es uno de los antioxidantes más poderosos y menos tóxicos. Participa en varios procesos biológicos como la hidroxilación del colesterol en el hígado. Además, debido a sus propiedades reductoras, mejora la estabilidad y utilización del ácido fólico y vitamina E y, entre

otras funciones, también interrumpe la cadena de peroxidación lipídica¹²⁵.

La vitamina E o tocoferol, por su parte, es capaz de captar radicales del oxígeno, dando lugar al radical tocoferoxi, que puede ser regenerado por el ubiquinol, GSH y probablemente por la vitamina C¹²⁶.

Además, se ha estudiado que las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GRd requieren oligoelementos (Cu, Zn, Mn, Fe, Se) para su biosíntesis. Por ello, la disponibilidad de estos elementos traza es una forma de regulación de las enzimas antioxidantes en respuesta al estrés oxidativo¹²⁷.

2.3. Desequilibrio 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 (Ilustración 6). 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 (EO)**^{115,123}.

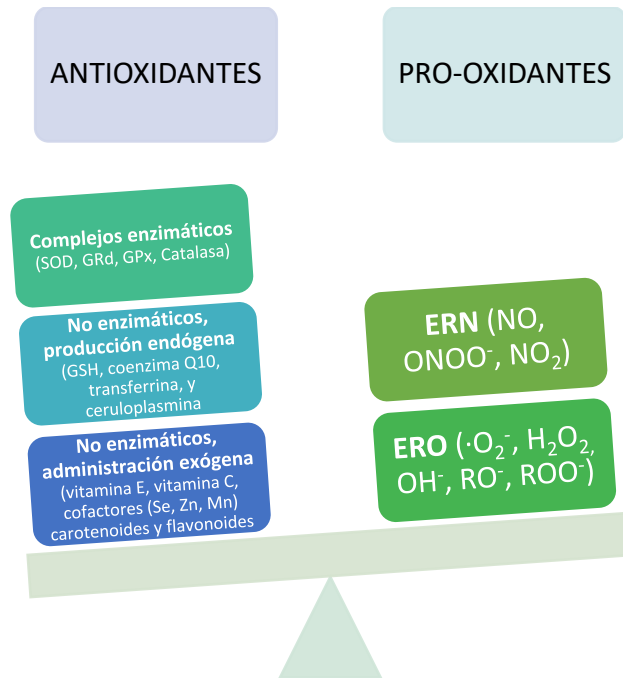


Ilustración 6. Balance entre agentes pro-oxidantes y antioxidantes

Este EO puede interrumpir el papel fisiológico de los oxidantes en la proliferación celular y defensa del huésped, a la vez que induce en la célula efectos tóxicos sobre las macromoléculas¹¹⁷. Además de estos efectos, un aumento en los niveles de ERO también puede constituir una señal de estrés que activa las vías específicas de señalización redox. Estas vías de señalización pueden tener funciones tanto dañinas, como potencialmente protectoras.

El daño oxidativo (DO) es el daño celular producido por el estrés oxidativo sobre distintas biomoléculas: lípidos, proteínas, y ADN.

Por un lado, la peroxidación lipídica por los radicales libres provoca una reacción en cadena, en la que la oxidación de un ácido graso desencadena una serie de reacciones oxidativas que traen consigo un daño a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados y, con ello, a la alteración de la permeabilidad de la membrana celular. La peroxidación lipídica se considera un factor muy importante en el envejecimiento de las células aeróbicas¹²⁸. Se trata de un proceso continuo y fisiológico que actúa como renovador de las membranas biológicas en condiciones normales, pero su excesiva activación ha sido implicada en el desarrollo de varias condiciones patológicas. El principal biomarcador de DO en los lípidos producido por la peroxidación lipídica es el isoprostano.

Por otro lado, las proteínas expuestas a los ERO pueden sufrir dos tipos de modificaciones químicas. Las primeras son, en su mayoría, irreversibles y se asocian a una pérdida permanente de la función, como la carbonilación (formación de aldehídos y cetonas), la nitración, la formación de enlaces proteína-proteína o la ruptura de enlaces peptídicos. Las segundas son reversibles, se producen sobre las cisteínas, activando la función proteica o protegiendo el residuo de la oxidación¹²⁹. El envejecimiento conlleva la acumulación de proteínas dañadas debido a que, con la edad, aumenta la velocidad de oxidación de las mismas,

disminuye la capacidad de su degradación, o ambas a la vez¹³⁰. El principal biomarcador de DO en las proteínas son las proteínas carboniladas.

De manera similar, los radicales libres pueden interaccionar con todos los componentes del ADN, dando lugar a un gran número de productos. Como consecuencia, se producen fenómenos de mutagénesis que comprometen su estructura. El ADN dañado es reparado por enzimas que cortan la parte afectada, pero como las enzimas reparadoras no llegan a eliminar todas las lesiones, éstas se acumulan, con lo que el número de mutaciones aumenta con la edad¹³¹. El principal biomarcador de DO en el ADN es la base modificada 8-hidroxideoxiguanosina (8OHdG).

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 restaurando dichas lesiones, activando diversos puntos de control del ciclo celular y, en última instancia, induciendo mecanismos de muerte celular, como la necrosis y la apoptosis¹³².

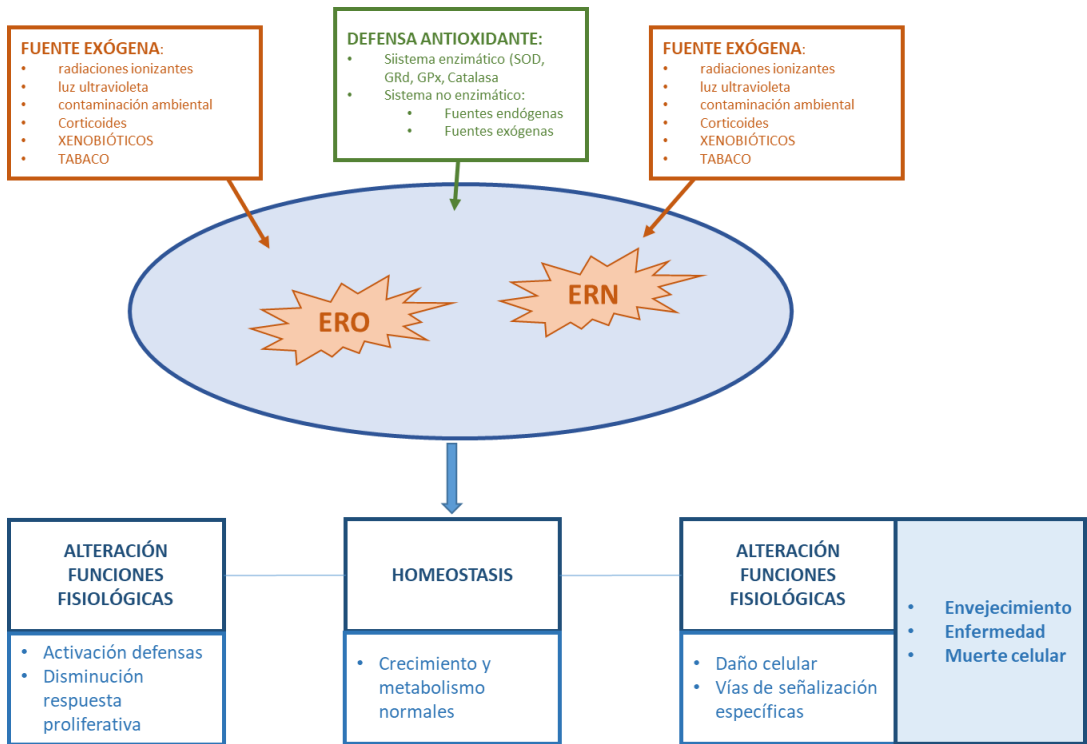


Ilustración 7. Efecto del estrés oxidativo y el sistema de defensa antioxidante (Adaptada de Rahman *et al.* *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2012; 3:997-1019)

En el proceso de necrosis, hay un desencadenante tóxico o patológico que afecta a la viabilidad de numerosas células vecinas. Además, se produce la 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 inflamatoria¹³³.

2.4. Relación entre estrés oxidativo y enfermedad

Además de haberse demostrado el papel del estrés oxidativo (EO) en el envejecimiento y muerte celular, en la actualidad, hay muchos estudios que lo relacionan con patologías de otra naturaleza. En referencia a las enfermedades cardiovasculares, se ha visto que el EO tiene relación con la hipertensión, la dislipemia, aterosclerosis, infarto de miocardio, angina de pecho y fallo cardíaco¹²³.



Ilustración 8. Efecto del estrés oxidativo en el cuerpo humano (Adaptada de Rahman et al. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2012; 3:997-1019)

Asimismo, se ha estudiado su papel en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, autismo, esquizofrenia, edema, o infarto cerebral¹²³.

También se le ha relacionado con enfermedades renales, diabetes, o enfermedades hepáticas, así como con patologías

oculares y cutáneas. Hay estudios que sugieren su papel en problemas de fertilidad, y en enfermedades como la fibromialgia y artritis reumatoide. En cuanto a las enfermedades del sistema circulatorio, el EO influye en la talasemia, hemocromatosis, hiperhomocistinemia, leucemia linfoblástica aguda y en la hipertensión¹²³.

Respecto a las patologías respiratorias, hay muchas observaciones que sugieren que el EO juega un papel importante en la patogenia del asma^{134,135,136}. Se ha observado que su incremento en pacientes asmáticos se asocia con una función pulmonar disminuida y algunos estudios han sugerido que el desequilibrio oxidante-antioxidante en las vías respiratorias juega un papel crítico en la patogenia de la fibrosis pulmonar idiopática^{137,138}.

Por otra parte, se ha sugerido que las ERO pueden estimular oncogenes tardíos como los *Jun* y *Fos*. La sobreexpresión del primero se asocia directamente con el cáncer de pulmón^{139,140}. Además, en los cánceres de pulmón, el gen p53 que se asocia con la producción de ERO, se ha visto que presenta mutaciones¹⁴¹.

En el ámbito de las enfermedades raras respiratorias, nuestro grupo ha demostrado que los pacientes con Déficit de Alfa-1

Antitripsina presentan un desequilibrio entre las sustancias oxidantes-antioxidantes, demostrándose que existe una menor actividad catalasa y unos niveles bajos de GSH¹⁴².

3. Justificación del estudio, hipótesis y objetivos.

3.1. Justificación del estudio

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 ERO y ERN para señalar y eliminar dichos agentes¹⁴³. No obstante, si el proceso inflamatorio es ineficiente y se hace crónico, se transforma en un proceso fisiopatológico que conlleva la producción desproporcionada de especies reactivas y, por consiguiente, un estrés oxidativo, que puede derivar en un incremento del riesgo a desarrollar enfermedades crónicas. De hecho, el EO induce la activación de factores de transcripción que producen mediadores de la inflamación, lo que supone un agravamiento de la respuesta inflamatoria¹⁴⁴.

En estudios previos, se ha revelado la estrecha relación de ambos procesos fisiopatológicos por presentarse de manera conjunta en múltiples patologías (aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, diabetes, cáncer y envejecimiento)¹¹³. Esto pone de manifiesto la necesidad de describir las características fisiológicas celulares que puedan incidir en la expresión clínica de estos procesos.

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 EO, 8-isoprostano, demostrándose que el estrés oxidativo se encuentra aumentado en el condensado de aire exhalado de niños con DCP¹⁴⁵.

Por todo ello, se plantea 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. Si a esto se añade la dificultad en el diagnóstico de la enfermedad, determinante para muchos pacientes que permanecen sin diagnosticar, se hace necesario plantear si el estrés oxidativo podría constituir una herramienta en la detección de este proceso.

Para ello es preciso determinar las especies reactivas que se generan en las células ciliadas, así como evaluar en ellas la función mitocondrial como posible fuente de producción. Debido a la elevada reactividad y relativa inestabilidad de los ERO y ERN, su detección en los sistemas biológicos resulta costosa¹¹³. 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 ERO/ERN con componentes celulares, que servirán como marcadores del

grado de oxidación. Entre estos se encuentran los productos de la peroxidación lipídica y los grupos carbonilo de la oxidación de las proteínas.

3.2. Hipótesis

No existen actualmente en la literatura resultados definitivos de los perfiles de estrés oxidativo en el epitelio respiratorio de pacientes afectados de DCP. En el presente trabajo planteamos la hipótesis de que los pacientes con DCP presentan unos niveles de estrés oxidativo en el epitelio nasal respiratorio compatibles con la prooxidación.

3.3. Objetivos

El **objetivo principal** de este estudio es determinar los niveles de estrés oxidativo en las células del epitelio nasal humano de pacientes con DCP, y compararlos con los de voluntarios sanos.

Para ello, los **objetivos secundarios** planteados son los siguientes:

- Determinar, mediante citometría de flujo, los marcadores de EO en células del epitelio nasal de pacientes con DCP: niveles de apoptosis y muerte celular total; daño oxidativo sobre proteínas y lípidos; niveles de

ERN y ERO totales y específicos de la mitocondria; de glutatión reducido (GSH); Ca^{2+} intracelular y potencial de membrana plasmático y mitocondrial; y masa mitocondrial.

- Comparar los parámetros de EO entre pacientes con DCP y controles.
- Valorar la asociación entre los parámetros de EO y las distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad.

4. Material y métodos

4.1. Pacientes

4.1.1. Aspectos éticos

Este proyecto de investigación se ha efectuado en la Unidad Central de Investigación Médica de la Fundación para la Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia-INCLIVA. El reclutamiento de pacientes y controles se ha llevado a cabo en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital General Universitario de Valencia (HGUV) y en la Unidad de Neumología Pediátrica del Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV). El proyecto cuenta con la aprobación de los Comités de Ética e Investigación del HCUV y el HGUV (Anexos 1 y 2), y se ajusta a la legalidad vigente en cuanto a la confidencialidad de las muestras y al uso de las bases de datos. Los participantes han sido informados sobre el proyecto, y sólo se han incluido sujetos que, tras esa información, han firmado el consentimiento (Anexo 3); en el caso de menores, la firma la han efectuado sus representantes legales. Asimismo, todo el trabajo se ha regido por los Principios Éticos para las Investigaciones Médicas en Seres Humanos de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial de 1975¹⁴⁶.

4.1.2. Anamnesis y evaluación general

Toda la información de los sujetos de estudio se ha introducido en una hoja de recogida de datos (Anexo 4), donde se han registrado los siguientes parámetros: fecha de nacimiento, edad en el momento de la toma de muestra, edad de comienzo de la clínica (años), sexo, peso, talla, índice de masa corporal (IMC), problemas de fertilidad, hábito tabáquico, antecedentes familiares de DCP o rinosinusitis crónica.

En referencia a la situación clínico-patológica de los pacientes, se ha valorado si presentan *situs inversus*, tos productiva crónica, rinorrea mucopurulenta, neumonías, bronquiectasias, atelectasias, asma, otitis, rinosinusitis, alergias o inmunodeficiencias.

En relación al diagnóstico de DCP, en todos los pacientes se ha estudiado el patrón y frecuencia de batido ciliar a través de video-microscopía de alta velocidad y en aquellos en los que se ha podido se han medido los niveles de nNO y estudiado la ultraestructura ciliar a través de microscopía electrónica (Anexo 5).

4.1.3. Población de estudio

El estudio se ha realizado en pacientes y controles del HCUV y el HGUV, ajustados por edad y sexo, distribuidos según los **criterios de inclusión** que se describen a continuación:

- Controles: Voluntarios sanos, no fumadores. Sin clínica respiratoria bronquial, enfermedad local o sistémica, alergias, o rinosinusitis.
- Pacientes con DCP: Con signos y síntomas propios de la enfermedad (Anexo 4), confirmada con tests diagnósticos específicos (Anexo 5). Aunque la mayoría tenían estudio de la ultraestructura ciliar y niveles de nNO, se ha considerado condición indispensable para ser diagnosticado de DCP la alteración funcional del cilio.

Los **criterios de exclusión** se extienden a los dos grupos de estudio mencionados 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 muestra, o haber consumido terapias antioxidantes en los 3 meses previos a dicha toma, ya que como se ha descrito anteriormente, todos estos antecedentes influyen en el estado redox.

4.1.4. Cálculo del tamaño muestral

El tamaño muestral se calculó en base a la población española y a la prevalencia de la DCP en España. Se ha descrito que en España hay una prevalencia de DCP de 20,5 casos por millón de habitantes (1/30.000 niños)¹⁸. Siendo que la población española en 2015, según el dato oficial del Instituto Nacional de Estadística, fue de 46.624.382 habitantes, se consideró un tamaño poblacional de 955.800. Se estableció un margen de error de $\pm 16,60\%$ (inferior al 20%) y un error α de 0,05. Utilizando dichos parámetros, se determinó que el número de pacientes a estudiar era de 35.

4.2. Determinación del perfil oxidativo mediante citometría de flujo

4.2.1. Principios de la 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 diversos 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:

- *Forward scatter (FSC)*, señal resultante de la dispersión frontal de la luz, cuya magnitud es aproximadamente proporcional al tamaño celular.
- *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
- 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. Los citómetros de flujo pueden medir distintas señales de fluorescencia de una misma

célula a la vez, lo que le confiere la capacidad de medir una gran cantidad de parámetros con una muestra relativamente pequeña.

Los aspectos de una célula que se miden por citometría de flujo se llaman parámetros. Algunos parámetros como el tamaño celular (*forward scatter*) o la complejidad interna celular (*side scatter*), son intrínsecos de la célula y no requieren ningún reactivo específico para su medida. Sin embargo, los parámetros extrínsecos sí que requieren la adición de moléculas o sondas fluorescentes para su medida¹⁴⁷.

Cada citómetro de flujo está conformado por tres sistemas (Ilustración 9):

- El **sistema de fluidos**, que se encarga de facilitar el transporte de partículas al punto de análisis. Está basado en la presión y se encarga del transporte de las partículas hacia el sistema óptico, y del enfoque de éstas para el análisis de células individuales.
- El **sistema óptico**, que está conformado por la óptica de iluminación y de colección. La primera está formada por láseres, espejos y lentes que enfocan los láseres a las partículas. La óptica de colección consiste en espejos y filtros ópticos que dirigen la luz a los detectores, que la

recogen de las longitudes de onda que emiten los fluorocromos.

- El **sistema electrónico**, que transforma la señal óptica en electrónica, y se encarga de procesar esta última hacia datos comprensibles e interpretables.

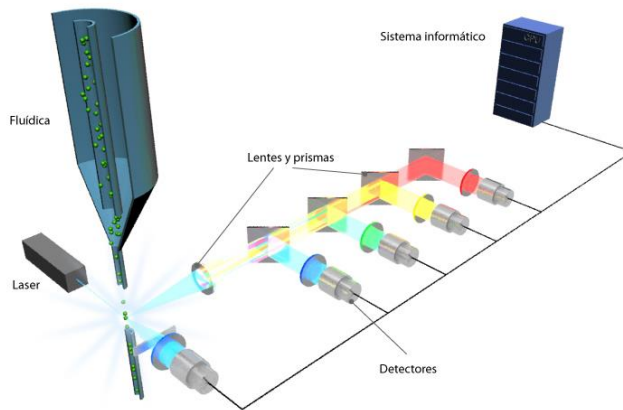


Ilustración 9. Representación esquemática de los elementos que componen un citómetro de flujo (Fuente: www.biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=1104a_tecnica_citometra; visto el 4 de abril de 2018).

4.2.2. Toma de muestras

Las células del epitelio nasal de los pacientes con DCP se obtuvieron mediante cepillado nasal. Un cepillo de citología (Covaca SA CE2005, Madrid, España) se introdujo en la nariz del paciente, frotando suavemente el cornete nasal medio, que es

el área con mayor densidad de células ciliadas. Se trata de una técnica mínimamente invasiva, indolora, rápida y exenta de riesgos. Las muestras se transportaban en Medio 199 (1X) con sales de Hanks, L-Glutamina y 500ml de HEPES 25mM (Gibco (Invitrogen 22350-029)), suplementado 1% con Penicilina/Estreptomicina [Gibco (Invitrogen 15070-063)]. Antes de cualquier marcaje para citometría, las muestras se filtraban con un filtro CellTrics® de 50µm (25004-0042-2317 Sysmex), y se contaban con el citómetro de flujo FACSVerse (BD Biosciences).

4.2.3. Reactivos

Las sondas fluorescentes Bis-(Ácido Dibutilbarbitúrico) Trimetín Oxonol (DIBAC), FLUO-4, 5-clorometil fluorescein diacetato (CMFDA), 4-Amino-5-Metilamino-2'7'-Difluorescein Diacetato (DAF-FM DA), 2'7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF), MitoSOX™ Red (MitoSOX), Mitotracker, BODIPY 665/676 C 11 (B665), Tetrametilrodamina (TMRM) y dihidrorodamina 1,2,3 (DHR1,2,3), eran de Molecular Probes (Eugene, OR). La Dihidroetidina (HE), Ioduro de Propidio (PI), fluorescein 5-tiosemicarbacida (FTC), 4', 6'-Diamidino-2-fenilindol dihidroclorido (DAPI), y Mitochondria Peroxy Yellow 1 (MitoPY 1) eran de Sigma. La Anexina V era de Immunostep (Salamanca, España).

El DIBAC es una sonda fluorescente sensible al potencial, que es capaz de entrar en células despolarizadas y unirse a proteínas o membranas intracelulares. Un incremento en la despolarización da lugar a un flujo incrementado de la sonda aniónica, y a un consiguiente aumento de la fluorescencia. Al contrario, la hiperpolarización provoca un descenso de los niveles de fluorescencia. Las sondas DIBAC se excluyen de la mitocondria debido a su carga negativa, lo que las hace ideales para medir potenciales de membrana plasmáticos¹⁴⁸. El FLUO-4 es una sonda fluorescente específica para detectar niveles de Ca^{2+} intracelular¹⁴⁹. El CMFDA es un indicador del nivel de tioles reducidos intracelulares, que incluye el glutatión reducido, principal antioxidante celular¹⁵⁰.

El DAF-FM DA no es fluorescente hasta que reacciona con el NO, formando un benzotriazol fluorescente, lo que confiere a esta sonda especificidad para detectar los niveles de NO¹⁵¹. El DCF es una sonda fluorescente que se usa comúnmente como indicador del estado REDOX celular para detectar niveles de peróxidos intracelulares. Esta sonda es un indicador de los niveles de peróxidos intracelulares, y no se oxida por O_2^- , NO y ClO^- ¹⁵². El MitoSOX es un indicador que puede entrar en las células vivas, y específicamente en las mitocondrias, dónde es rápidamente oxidado por el O_2^- , siendo específico para detectar O_2^- mitocondrial¹⁵³. El MitoTracker Green es una sonda fluorescente

que se localiza en la mitocondria, independientemente del potencial de membrana mitocondrial, por lo que es un buen indicador de la masa mitocondrial¹⁵⁴. Para medir la peroxidación lipídica se utiliza la sonda lipofílica BODIPY 665/676, que muestra un cambio en la emisión fluorescente tras la interacción con radicales peroxilo¹⁵⁵. El Ψ_m se analiza con TMRM, una sonda fluorescente que se acumula dentro de la mitocondria en proporción directa al potencial de membrana mitocondrial¹⁵⁶. La DHR 123 es un indicador de ERO sin carga y sin fluorescencia, que puede difundir pasivamente a través de las membranas, dónde se oxida a rodamina 123 catiónica, emitiendo fluorescencia en verde. Se activa por varias ERO, que incluyen el O_2^- y el ONOO⁻¹⁵⁷.

El O_2^- se detecta específicamente con HE, una sonda fluorescente que se oxida e hidroxila selectivamente por el O_2^- a 2-OH-etidio, emitiendo fluorescencia cuando se une al ADN¹⁵⁸. Los niveles de oxidación proteica se miden mediante el FTC, una molécula que emite fluorescencia verde cuando interacciona con los grupos carbonilo de las proteínas^{159,160}. El MitoPY es una sonda fluorescente permeable a las células que se dirige selectivamente a las mitocondrias de las células vivas. Es específica para detectar H_2O_2 mitocondrial¹⁶¹.

Las células muertas pueden comprometer el análisis de datos por citometría de flujo, especialmente cuando se están estudiando condiciones fisiológicas como es el caso del estrés oxidativo. Puesto que la viabilidad celular suele determinarse midiendo la capacidad de las células para excluir las sondas vitales, nosotros hemos descartado las células muertas de todos nuestros análisis mediante la adición de una sonda de unión al DNA (DAPI o PI, dependiendo del diseño particular)¹⁶².

Además, el PI se usa -en combinación con la Anexina V- para determinar si las células son viables, apoptóticas o necróticas mediante diferencias en la integridad y permeabilidad de la membrana plasmática. Por un lado, el PI no marca células vivas o en apoptosis temprana, puesto que éstas mantienen la integridad de la membrana. En células en apoptosis tardía o necróticas, la integridad de las membranas plasmática y nuclear decrece, permitiendo al PI entrar, unirse a los ácidos nucleicos, y emitir fluorescencia roja. Por otro lado, la Anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente del Ca^{2+} de 35-36 kDa con gran afinidad por la fosfatidilserina, que se une a la fosfatidilserina expuesta en la superficie de las células apoptóticas¹⁶³.

Los fluorocromos se almacenaban a -20°C , a las siguientes concentraciones (diluidas en DMSO): FLUO-4 ($50\mu\text{M}$), DIBAC

(100 μ M), CMFDA(10 μ M), DAF-FM DAF(1,25mM), DCF(1mg/ml), MitoSOX(0,5mM), Mitotracker(10 μ M), B665(1mM), TMRM(240 μ M), DHR1,2,3 (5mM), HE(1mg/ml), FTC(1mM), MitoPY (1mM), DAPI (1mg/ml). La Anexina V y el PI(1mg/ml) se guardaban a 4°C.

Las concentraciones finales de trabajo eran: FLUO-4 (0,5 μ M), DIBAC (1,2 μ M), CMFDA (25nM), DAF-FM DAF(1 μ M), DCF (2,5 μ g/ml), MitoSOX (640nM), Mitotracker (78nM), B665 (800nM), TMRM (600nM), DHR1,2,3 (100 μ M), HE (2,5 μ g/ml), FTC (800nM), MitoPY (4 μ M), PI (8 μ g/ml), DAPI (800ng/ml).

Además, se usaron distintos reactivos como controles de las medidas. El NOR-1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) se usó como dador de NO¹⁶⁴. La Plumbagina para aumentar los niveles de O₂⁻ ¹⁶⁵. La carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) como desacoplador, para reducir el potencial de membrana¹⁶⁶. El hidroperóxido Tert-butil (t-BHP), un oxidante químico, se utilizó como control de varios experimentos¹⁶⁷. El ionóforo Ionomicina, altamente selectivo de Ca²⁺, para estimular el influjo de Ca²⁺. La menadiona para aumentar los niveles de carbonilación proteica¹⁶⁸. El dietil maleato (DEM) produce depleción de GSH cuando se conjuga con éste bajo la acción de la glutatión-S-transferasa¹⁵⁰. El NOR-1 procedía de Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas. La

Plumbagina, FCCP, t-BHP, DEM, menadiona e Ionomicina, eran de Sigma, St. Louis, MO.

El NOR-1, Plumbagina, FCCP e Ionomicina se almacenaron a -20°C, a las siguientes concentraciones (diluidas en DMSO): NOR-1 (1mg/ml), Plumbagina (2,8mg/ml), FCCP (10mM), Ionomicina (1,338mM), DEM, menadiona (10mg/ml). El t-BHP, diluido en PBS, se guardó a 4°C a una concentración *stock* de 7,7mM.

Las concentraciones de trabajo finales fueron: NOR-1(16µg/ml), Plumbagina (2,24µg/ml), FCCP (52µM), Ionomicina (50µM), DEM (20mM), menadiona (1mM) y t-BHP (100µM).

4.2.4. Marcaje fluorescente

Las dos tablas que se muestran a continuación son un resumen de las concentraciones *stock* y de trabajo de los reactivos, así como de la temperatura de almacenaje, de los protocolos de incubación en los tubos basales y en los controles positivos, y de los citómetros, láseres y detectores específicos utilizados en cada medida.

Tabla 3. Tabla resumen de los protocolos de citometría basales.

| Reactivo | Medida | [] stock | Tª almacenamiento | [] final | Citómetro de flujo | Láser de excitación | Detector | Nº de células | Vol. total | Tiempo incubación | Tª incubación |
|------------------|-------------------------------|-----------|-------------------|-----------|--------------------|---------------------|--------------|---------------|------------|-------------------|---------------|
| DIBAC | Potencial membrana plasmático | 100µM | -20°C | 1,2µM | FACS Verse | Azul (488nm) | 527/32 507LP | 8000 | 250µl | 20 min | 37°C |
| FLUO-4 | Ca ²⁺ intracelular | 50µM | -20°C | 0,5µM | LSR Fortessa X-20 | Azul (488nm) | 530/30 505LP | 8000 | 250µl | 20 min | 37°C |
| CMFDA | Tioles reducidos (GSH) | 10µM | -20°C | 25nM | FACS Verse | Azul (488nm) | 527/32 507LP | 8000 | 250µl | 20 min | 37°C |
| DAF-FM DA | NO | 1,25mM | -20°C | 1µM | LSR Fortessa X-20 | Azul (488nm) | 530/30 505LP | 8000 | 250µl | 20 min | 37°C |
| DCF | Peróxidos intracelulares | 1mg/mL | -20°C | 2,5µg/mL | FACS Verse | Azul (488nm) | 527/32 507LP | 8000 | 250µl | 20 min | 37°C |
| MitoSOX | O ₂ - mitocondrial | 0,5mM | -20°C | 640nM | FACS Verse | Azul (488nm) | 700/54 665LP | 8000 | 250µl | 20 min | 37°C |

Material y métodos

| Reactivo | Medida | [] stock | Tª almacenamiento | [] final | Citómetro de flujo | Láser de excitación | Detector | Nº de células | Vol. total | Tiempo incubación | Tª incubación |
|--------------------------|----------------------------------|-----------|-------------------|-----------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------|------------|-------------------|---------------|
| Mitotracker green | Masa mitocondrial | 10µM | -20°C | 78nM | FACS Verse | Azul (488nm) | 527/32 507LP | 8000 | 250µl | 20 min | 37°C |
| BODIPY 665/676 | Ratio lípidos oxidados/reducidos | 1mM | -20°C | 800nM | FACS Aria III | Azul (488nm) y Rojo (635nm) | 586/42 556LP y 780/60 735LP | 12000 | 250µl | 30 min | 37°C |
| TMRM | Ψ_m mitocondrial | 240µM | -20°C | 600nM | FACS Verse | Azul (488nm) | 586/42 560LP | 8000 | 250µl | 20 min | 37°C |
| DHR 123 | ONOO- | 5mM | -20°C | 100µM | LSR Fortessa X-20 | Azul (488nm) | 530/30 505LP | 12000 | 250µl | 20 min | 37°C |
| HE | O ₂ ⁻ | 1mg/mL | -20°C | 2,5µg/mL | FACS Verse | Azul (488nm) | 700/54 665LP | 8000 | 250µl | 20 min | 37°C |
| FTC | Carbonilación de proteínas | 1mM | -20°C | 800nM | FACS Verse | Azul (488nm) | 527/32 507LP | 8000 | 250µl | 20 min | 37°C |

Material y métodos

| Reactivo | Medida | [] stock | Tª almacenamiento | [] final | Citómetro de flujo | Láser de excitación | Detector | Nº de células | Vol. total | Tiempo incubación | Tª incubación |
|------------------|-------------------|-----------|-------------------|--------------|--------------------|---------------------|-----------------|---------------|------------|-------------------|---------------|
| MitoPY | H2O2 mitocondrial | 1mM | -20°C | 4µM | FACS Verse | Azul (488nm) | 527/32 507LP | 8000 | 250µl | 20 min | 37°C |
| DAPI | Muerte celular | 1mg/mL | -20°C | 800ng/ mL | FACS Verse | Violeta (405nm) | 448/45 | 8000 | 250µl | 20 min | 37°C |
| PI | Muerte celular | 1mg/mL | 4°C | 8µg/mL | FACS Verse | Azul (488nm) | 586/42 560LP | 12000 | 100µl | 15 min | RT |
| Anexina V | Apoptosis | - | 4°C | - | FACS Verse | Azul (488nm) | 527/32 507LP | 12000 | 100µl | 15 min | RT |

Material y métodos

Tabla 4. Tabla resumen de los protocolos de citometría para los controles positivos de cada marcaje.

| Reactivo | Medida | Control positivo (inductor) | [] Stock inductor | [] final inductor | Tª almacenamiento inductor | Tiempo incubación inductor | Tª incubación inductor | Tiempo incubación fluorocromos | Tª con fluorocromos |
|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------|--------------------------------|---------------------|
| DIBAC | Potencial membrana plasmático | t-BHP | 7,7mM | 100µM | 4°C | 15 min | 37°C | 30 min | 37°C |
| FLUO-4 | Ca ²⁺ intracelular | Ionomicina | 1,338mM | 50µM | -20°C | Cinética | | Cinética | |
| CMFDA | Tioles reducidos (GSH) | DEM | - | 20mM | -20°C | 90 min | 37°C | 30 min | 37°C |
| DAF-FM DA | NO | NOR-1 | 1mg/mL | 16µg/mL | -20°C | Cinética | | Cinética | |
| DCF | Peróxidos intracelulares | t-BHP | 7,7mM | 100µM | 4°C | 15 min | 37°C | 30 min | 37°C |
| MitoSOX | O ₂ - mitocondrial | PB | 2,8mg/mL | 2,24µg/mL | -20°C | 15 min | 37°C | 30 min | 37°C |
| BODIPY 665/676 | Ratio lípidos oxidados/reducidos | t-BHP | 7,7mM | 100µM | 4°C | 15 min | 37°C | 30 min | 37°C |
| TMRM | Ψ _m mitocondrial | FCCP | 10mM | 52µM | -20°C | 15 min | 37°C | 30 min | 37°C |

Material y métodos

| Reactivo | Medida | Control positivo (inductor) | [] Stock inductor | [] final inductor | Tª almacenamiento inductor | Tiempo incubación inductor | Tª incubación inductor | Tiempo incubación fluorocromos | Tª con fluorocromos |
|----------------|--|-----------------------------|--------------------|---------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------|--------------------------------|---------------------|
| DHR 123 | ONOO- | NOR-1 y PB | 1mg/mL y 2,8mg/mL | 16µg/mL y 2,24µg/mL | -20°C | Cinética | | Cinética | |
| HE | O ₂ ⁻ | PB | 2,8mg/mL | 2,24µg/mL | -20°C | 15 min | 37°C | 30 min | 37°C |
| FTC | Carbonilación de proteínas | Menadiona | 10mg/mL | 1mM | -20°C | 60 min | 37°C | 30 min | 37°C |
| MitoPY | H ₂ O ₂ mitocondrial | t-BHP | 7,7mM | 100µM | 4°C | 15 min | 37°C | 30 min | 37°C |

4.2.4.1. Incubaciones basales

Cada tubo individual se preparaba con 8000 células, diluidas en PBS hasta un volumen total de 250µl. Se incubaron en oscuridad durante 20min a 37°C con una de las sondas fluorescentes indicadas (TMRM, DCF, HE, CMFDA, MitoSOX, Mitotracker, FTC, DIBAC, o MitoPY) y DAPI o PI, para excluir las células muertas. Además, se preparaba un tubo individual con 12000 células, diluidas en PBS hasta un volumen total de 250µl, e incubado durante 30 min a 37°C con B665. Las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo con los parámetros adecuados.

4.2.4.2. Incubaciones controles positivos

Además de los tubos basales, se incluyeron los controles positivos de todas las medidas. Para ello, los mismos fluorocromos se añadieron a los tubos previamente incubados con los respectivos inductores. El t-BHP se usó para la inducción en los tubos de B665, DCF, MitoPY y DIBAC; la PB se utilizó para los tubos de HE y MitoSOX; el DEM como control del CMFDA; la menadiona como control del FTC; y el FCCP como control del TMRM. Cada tubo se incubó en oscuridad durante 15 min (excepto la menadiona que se incubó durante una hora, y el DEM durante 90min), a 37°C, con sus respectivos inductores. Después, cada tubo individual se incubó en oscuridad durante 30min a 37°C, con los respectivos fluorocromos y DAPI o PI para

excluir las células muertas. Las muestras fueron analizadas posteriormente con el citómetro de flujo ajustado con los parámetros adecuados.

4.2.4.3. Cinética de la generación de NO

Se prepararon tubos individuales con 12000 células, diluidas en PBS hasta un volumen total de 250µl, se incubaron en oscuridad durante 20 min a 37°C con DAF-FM DA y DAPI para excluir células muertas. Las muestras fueron analizadas *a posteriori* con el citómetro de flujo ajustado con los parámetros adecuados, obteniendo así la fluorescencia basal. A continuación, la adquisición se paró 2 veces para añadir dos dosis del dador de NO, NOR-1, y se continuó la adquisición hasta los 300s.

4.2.4.4. Cinética de la generación de ONOO⁻

Se prepararon tubos individuales con 12000 células, diluidas en PBS hasta un volumen total de 250µl, y se incubaron en oscuridad durante 20 min, a 37°C, con DHR1,2,3 y DAPI para excluir las células muertas. Las muestras fueron analizadas *a posteriori* con el citómetro de flujo ajustado con los parámetros adecuados, obteniendo así la fluorescencia basal. A continuación, la adquisición se paró dos veces: para añadir PB, el dador de O₂⁻ y NOR-1, el dador de NO (puesto que el ONOO⁻ se

genera a partir de O_2^- y NO) y se continuó la adquisición hasta los 200s.

4.2.4.5. Cinética de la generación de Ca^{2+}

Se prepararon tubos individuales con 12000 células, diluidas en PBS hasta un volumen total de 250 μ l. Se incubaron en oscuridad durante 20 min, a 37°C, con FLUO-4 y DAPI para excluir las células muertas. Las muestras fueron analizadas *a posteriori* con el citómetro de flujo ajustado con los parámetros adecuados, obteniendo así la fluorescencia basal. A continuación, la adquisición se paró para añadir el ionóforo Ionomicina, y se continuó la adquisición hasta los 300s.

4.2.4.6. Ensayo de apoptosis

Se prepararon tubos individuales con 12000 células, diluidas en PBS hasta un volumen total de 100 μ l. Se incubaron en oscuridad, durante 15 min a temperatura ambiente, con Anexina V, PI y 100 μ l de *Annexin V binding buffer* (previamente diluido 1/10 en PBS). Tras la incubación, se añadieron 300 μ l de la dilución 1/10 de *Annexin V binding buffer*. Las muestras fueron analizadas *a posteriori* con el citómetro de flujo ajustado con los parámetros adecuados.

4.2.5. Configuración de los citómetros y análisis de datos

Todos los ensayos por citometría de flujo se realizaron usando el citómetro FACSVerse (BD Biosciences), excepto la *ratio* entre lípidos oxidados y reducidos- que se llevó a cabo usando el citómetro FACS Aria III (BD Biosciences)- y las cinéticas del NO, ONOO⁻ y Ca²⁺, - que se realizaron con el LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences).

Se usaron los láseres Azul (488nm), Violeta (405nm), y Rojo (635nm). La fluorescencia del DCF, CMFDA, FTC, Mitotracker, Anexina V, DIBAC y MitoPY se recogió en un filtro 527/32 507LP. La fluorescencia del MitoSOX y HE en un filtro 700/54 665LP, y la del TMRM y PI con un filtro 586/42 560LP. La fluorescencia del DAPI en un filtro 448/45. La del B665 en unos filtros 586/42 556LP y 780/60 735LP. La del DAF, DHR1,2,3 y FLUO-4 en un filtro 530/30 505LP.

El *software* BD FACSSuite se usó para la adquisición de datos en el citómetro FACSVerse, y el *software* FACSDiva 4.0 para los citómetros FACS Aria III y LSR Fortessa X-20. El análisis *off-line* de los datos se hizo con el *software* FLOWJO V.10.1.

4.3. Puesta a punto del análisis del perfil oxidativo mediante citometría de flujo

Puesto que no existía experiencia previa en la determinación de los parámetros de estrés oxidativo en las células del epitelio nasal humano por citometría de flujo, y que se iban a determinar una gran variedad de ellos, previamente a la recogida de datos de los pacientes y controles hubo una compleja “puesta a punto” de la técnica. Además del ajuste de la cantidad de células, concentración de los reactivos y voltajes empleados, se utilizaron controles positivos para asegurar que cada uno de los parámetros a evaluar se determinaba correctamente. Los resultados de esa “puesta a punto” se exponen a continuación, en los distintos subapartados de esta sección.

La figura 1 recoge la estrategia para el *gating* de poblaciones utilizada para todos los parámetros. Las células del epitelio nasal se seleccionaban inicialmente por morfología, mediante medida en el canal del *Forward Scatter (FSC)*, que es un indicador del tamaño celular, y en el *Side Scatter (SSC)*, que informa de la complejidad interna de las células (1A). Después se seleccionaban las células individuales del total de la población de

células del epitelio nasal, descartando los dobletes, mediante la confrontación de la altura (*High-FSC*) frente al área (*Area-FSC*) del FSC (1B). De éstas células individuales, se excluían las células muertas utilizando DAPI o PI como discriminadores (1C).

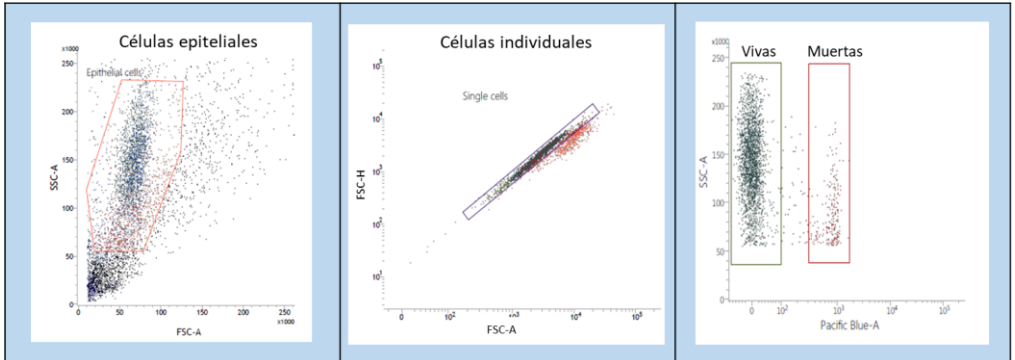


Figura 1. Estrategia de *gating* utilizada para seleccionar la población de interés en el citómetro FACS Verse.

4.3.1. Función mitocondrial

La siguiente tabla muestra los resultados de la detección de los niveles de potencial de membrana mitocondrial, masa mitocondrial y H_2O_2 y O_2^- mitocondriales tras haber incubado las células del epitelio nasal con los respectivos fluorocromos e inductores (en el caso de los controles positivos). La estrategia de *gating* utilizada ha sido la mencionada en el punto 4.3, y para discriminar las células muertas se ha utilizado DAPI en todos los tubos.

Tabla 5. Tabla que muestra un ejemplo de los marcajes basales y los controles positivos para cada parámetro mitocondrial medido. Se muestran el número de eventos, porcentaje de células vivas tras la estrategia de *gating*, valores de fluorescencia arbitrarios para cada marcaje, reactivos utilizados, y el parámetro que miden.

| Muestra | Eventos | % células vivas | Media FITC-A (uaf) | Media PE-A (uaf) | Reactivos | Parámetro |
|---------|---------|-----------------|--------------------|------------------|-------------------|--|
| 1 | 1184 | 42,16% | | 2763 | TMRM | Potencial de membrana mitocondrial |
| 2 | 984 | 42,48% | | 540 | FCCP + TMRM | |
| 3 | 1215 | 46,83% | 2534 | | Mitotracker Green | Masa mitocondrial |
| 4 | 996 | 49,73% | 473 | | MitoPY | H ₂ O ₂ mitocondrial |
| 5 | 984 | 48,40% | 652 | | t-BHP + MitoPY | |
| 6 | 1198 | 46,60% | | 750 | Mitosox | O ₂ ⁻ mitocondrial |
| 7 | 1086 | 45,81% | | 1108 | PB + Mitosox | |

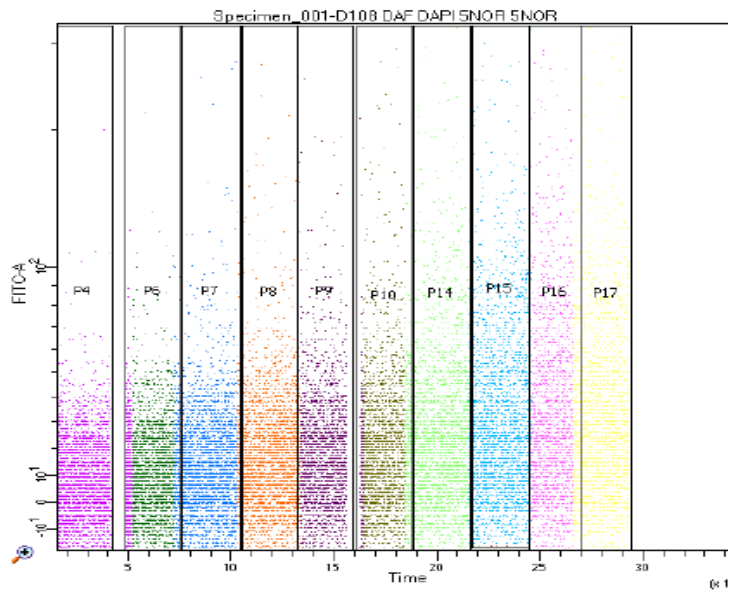
4.3.2. Generación de ERO y ERN

La siguiente tabla muestra los resultados de la detección de los niveles de peróxidos intracelulares y O₂⁻ intracelular total tras haber incubado las células del epitelio nasal con los respectivos fluorocromos e inductores (en el caso de los controles positivos). La estrategia de *gating* utilizada ha sido la mencionada en el punto 4.3 y para discriminar las células muertas se ha utilizado DAPI en todos los tubos.

Tabla 6. Tabla que muestra un ejemplo de los marcajes basales y los controles positivos para los peróxidos intracelulares y el O_2^- total. Se muestran el número de eventos, porcentaje de células vivas tras la estrategia de *gating*, valores de fluorescencia arbitrarios para cada marcaje, reactivos utilizados, y el parámetro que miden.

| Muestra | Eventos | % células vivas | Media DCF-FITC (uaf) | Media HE-PE (uaf) | Reactivos | Parámetro |
|---------|---------|-----------------|----------------------|-------------------|-------------|-------------------------------|
| 1 | 1037 | 47,16% | 573 | | DCF | Nivel intracelular peróxido |
| 2 | 925 | 52,05% | 1010 | | t-BHP + DCF | |
| 3 | 1044 | 42,35% | | 694 | HE | Nivel intracelular de O_2^- |
| 4 | 968 | 40,46% | | 1101 | PB + HE | |

Para el seguimiento en tiempo real de la generación de NO, se diseñó una cinética. Como se ha descrito en la sección de Material y métodos, las células se incubaron previamente con DAF y DAPI. Las células del epitelio nasal humano se seleccionaron en base a su morfología. De ésta población se escogieron las células individuales, eliminando los dobletes y se descartaron las células muertas en base al marcaje con DAPI. Se empezó la adquisición de la muestra para obtener la fluorescencia basal. Tras ello, la adquisición se paró dos veces, para añadir dos dosis de NOR-1, el dador de NO, continuando después la adquisición hasta los 300s. La cinética de generación de NO se muestra en la ilustración 10A, y los porcentajes de *gating* y los valores de fluorescencia para el DAF, en la 10B.

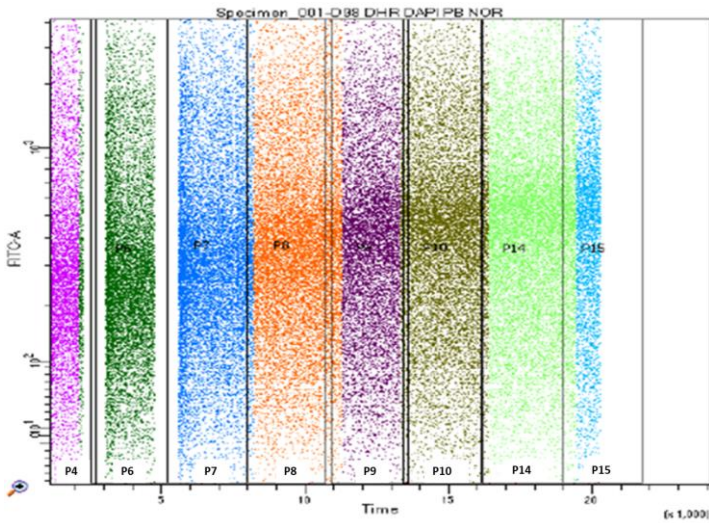


| Population | #Events | %Parent | FITC-A Mean | Time Mean |
|------------|---------|---------|-------------|-----------|
| All Events | 29,381 | #### | 20 | 14,105 |
| P4 | 4,082 | 13.9 | 9 | 2,911 |
| P6 | 3,245 | 11.0 | 13 | 6,628 |
| P7 | 4,192 | 14.3 | 15 | 9,199 |
| P8 | 4,162 | 14.2 | 18 | 12,303 |
| P9 | 3,769 | 12.8 | 19 | 15,345 |
| P10 | 3,122 | 10.6 | 23 | 17,845 |
| P14 | 3,827 | 13.0 | 29 | 20,475 |
| P15 | 3,766 | 12.8 | 34 | 23,552 |
| P16 | 2,807 | 9.6 | 37 | 26,095 |
| P17 | 2,407 | 8.2 | 38 | 27,964 |

Ilustración 10. 10A) Cinética de generación de NO, en la que se ven los dos puntos en los que se ha parado la adquisición para añadir las dos dosis de NOR-1, inductor de NO. 10B) Tabla en la que se muestran los porcentajes de *gating* y los niveles de fluorescencia para el DAF (indicadores de los niveles de H₂O₂), que aumentan con el paso del tiempo.

De forma similar, para el seguimiento en tiempo real de la generación de ONOO⁻ intracelular, se diseñó una cinética. Como se ha descrito en la sección de material y métodos, las células se

incubaron previamente con DHR1,2,3 y DAPI. Las células del epitelio nasal humano se seleccionaron en base a su morfología. De ésta población, se escogieron las células individuales, eliminando los dobletes, y se descartaron las células muertas en base al marcaje con DAPI. Se empezó la adquisición de la muestra para obtener la fluorescencia basal. Tras ello, la adquisición se paró para añadir PB, el dador de O_2^- , continuándose después. Se volvió a parar para añadir NOR-1, el dador de NO y se continuó hasta los 200s. La cinética de generación de $ONOO^-$ a partir de O_2^- y NO se muestra en la ilustración 11A, y los porcentajes de *gating* y los valores de fluorescencia para la DHR1,2,3, en la 11B.



| Population | #Events | %Parent | FITC-A Mean | Time Mean |
|------------|---------|---------|-------------|-----------|
| All Events | 100.000 | #### | 569 | 10,105 |
| P4 | 20.842 | 20.8 | 457 | 2,062 |
| P6 | 18.238 | 18.2 | 465 | 4,261 |
| P7 | 20.956 | 21.0 | 503 | 7,170 |
| P8 | 15.198 | 15.2 | 533 | 9,722 |
| P9 | 15,074 | 15.1 | 556 | 12,802 |
| P10 | 20,111 | 20.1 | 581 | 15,347 |
| P14 | 14,663 | 14.7 | 593 | 17,912 |
| P15 | 3,860 | 3.9 | 588 | 19,878 |

Ilustración 11. 11A) Cinética de generación de ONOO⁻; en la que se ven los dos puntos en los que se ha parado la adquisición para añadir la PB, dador de O₂⁻, y el NOR-1, inductor de NO. 11B) Tabla en la que se muestran los porcentajes de *gating*, y los niveles de fluorescencia para la DHR123 (indicadores de niveles de ONOO⁻), que aumentan con el paso del tiempo

4.3.3. Detección de GSH

La siguiente tabla muestra los resultados de la detección de los niveles de GSH total tras haber incubado las células del epitelio nasal con CMF y DEM (en el caso de los controles positivos). La

estrategia de *gating* utilizada ha sido la mencionada en el punto 4.3, y para discriminar las células muertas se ha utilizado DAPI.

Tabla 7. Tabla que muestra un ejemplo de los marcajes basales y los controles positivos para los niveles de GSH (en este caso se ha utilizado DEM, un deplecionador de GSH). Se muestran el número de eventos, el porcentaje de células vivas tras la estrategia de *gating*, los valores de fluorescencia arbitrarios para cada marcaje, los reactivos utilizados, y el parámetro que miden.

| Muestra | Eventos | % células vivas | Media GSH-FITC (uaf) | Reactivos | Parámetro |
|---------|---------|-----------------|----------------------|-----------|-----------|
| 1 | 2952 | 51,16% | 1216 | CMF | GSH |
| 2 | 2848 | 41,26% | 261 | DEM + CMF | |

4.3.4. Detección del potencial de membrana plasmático y los niveles de Ca²⁺ intracelular

Para el seguimiento, en tiempo real, de la generación de Ca²⁺ intracelular, se diseñó una cinética. Como se ha descrito en la sección de material y métodos, las células se incubaron previamente con FLUO-4 y DAPI. Las procedentes del epitelio nasal humano se seleccionaron en base a su morfología. De ésta población, se separaron las células individuales, eliminando los dobletes, y se descartaron las células muertas en base al marcaje con DAPI. Se empezó la adquisición de la muestra, para obtener la fluorescencia basal. Tras ello se paró para añadir el ionóforo Ionomicina, altamente selectivo para el Ca²⁺ intracelular, continuando después la adquisición hasta los 600s. Los

porcentajes de *gating* y los valores de fluorescencia para el FLUO-4 se muestran en la ilustración 12.

| Population | #Events | %Parent | FITC-A Mean | Time Mean |
|------------|---------|---------|-------------|-----------|
| All Events | 23,369 | #### | 223 | 41,268 |
| P4 | 1,133 | 4.8 | 163 | 2,755 |
| P6 | 1,356 | 5.8 | 258 | 6,207 |
| P7 | 1,142 | 4.9 | 274 | 9,212 |
| P8 | 1,065 | 4.6 | 268 | 12,297 |
| P9 | 1,111 | 4.8 | 245 | 15,352 |
| P10 | 806 | 3.4 | 285 | 17,963 |
| P14 | 1,108 | 4.7 | 234 | 20,431 |
| P15 | 1,117 | 4.8 | 240 | 23,576 |
| P16 | 859 | 3.7 | 272 | 26,128 |

Ilustración 12. Tabla en la que se muestran los porcentajes de *gating*, y los niveles de fluorescencia para el Ca^{2+} intracelular, que aumentan con el paso del tiempo por la acción del ionóforo.

La siguiente tabla muestra los resultados de la detección de los niveles potencial de membrana plasmático tras haber incubado las células del epitelio nasal con DIBAC y t-BHP (en el caso de los controles positivos). La estrategia de *gating* utilizada ha sido la mencionada en el punto 4.3, y para discriminar las células muertas se ha utilizado PI.

Tabla 8. Tabla que muestra un ejemplo de los marcajes basales y los controles positivos para los niveles de potencial de membrana plasmático (PMP). Se muestran el número de eventos, porcentaje de células vivas tras la estrategia de *gating*, valores de fluorescencia arbitrarios para cada marcaje, reactivos utilizados, y el parámetro que miden.

| Muestra | Eventos | % células vivas | Media DIBAC-FITC (uaf) | Reactivos | Parámetro |
|---------|---------|-----------------|------------------------|---------------|-----------|
| 1 | 1857 | 40,81% | 740 | DIBAC | PMP |
| 2 | 1769 | 40,93% | 115 | t-BHP + DIBAC | |

4.3.5. Análisis del daño oxidativo sobre proteínas y lípidos

La siguiente tabla muestra los resultados de la detección de los niveles de proteínas carboniladas tras haber incubado las células del epitelio nasal con FTC y menadiona (en el caso de los controles positivos). La estrategia de *gating* utilizada ha sido la mencionada en el punto 4.3, y para discriminar las células muertas se ha utilizado DAPI.

Tabla 9. . Tabla que muestra un ejemplo de los marcajes basales y los controles positivos para los niveles de proteínas carboniladas. Se muestran el número de eventos, porcentaje de células vivas tras la estrategia de *gating*, valores de fluorescencia arbitrarios para cada marcaje, reactivos utilizados, y el parámetro que miden.

| Muestra | Eventos | % células vivas | Media FTC-FITC (uaf) | Reactivos | Parámetro |
|---------|---------|-----------------|----------------------|-----------------|------------------------|
| 1 | 984 | 43,36% | 7806 | FTC | Proteínas carboniladas |
| 2 | 1151 | 46,04% | 15045 | Menadiona + FTC | |

La figura 2 muestra la estrategia para la detección, *gating* y medida de los valores de fluorescencia correspondientes a los niveles de peroxidación lipídica en las células del epitelio nasal humano, tras su incubación con B665. Las células del epitelio nasal se seleccionaron por morfología, después se eliminaron los dobletes, y se determinaron los niveles de fluorescencia para el B665. La tabla 10 recoge los resultados de una muestra, que se incubó previamente con t-BHP, y después con B665.

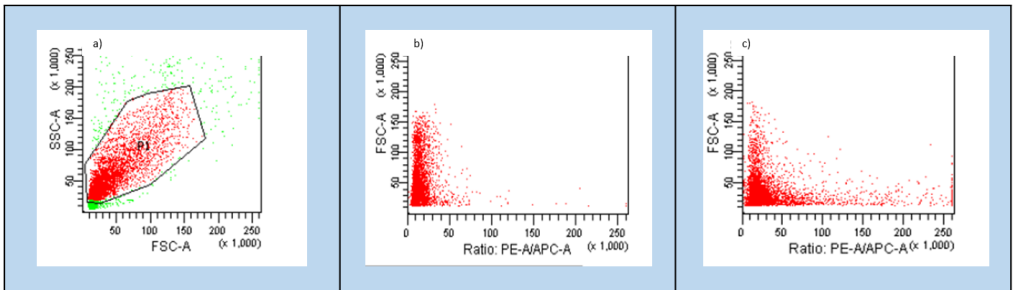


Figura 2. Estrategia de *gating* utilizada para seleccionar la población de interés en el citómetro FACS Aria.

Tabla 10. Tabla que muestra un ejemplo de los marcajes basales y los controles positivos para los niveles de peroxidación lipídica. Se muestran el número de eventos, el porcentaje de células vivas tras la estrategia de *gating*, los valores de fluorescencia arbitrarios para cada marcaje, los reactivos utilizados, y el parámetro que miden.

| Muestra | Eventos | % células vivas | Ratio | | Parámetro |
|---------|---------|-----------------|-------------|--------------|-----------------------|
| | | | B665-PE/APC | Reactivos | |
| 1 | 4957 | 52,15% | 7806 | B665 | Peroxidación lipídica |
| 2 | 4314 | 54,98% | 15045 | t-BHP + B665 | |

4.3.6. Detección de los niveles de apoptosis y muerte celular

La ilustración 13 recoge los niveles de muerte celular en las células del epitelio nasal humano tras marcar las muestras con AnexinaV y PI, como se describe en la sección de Material y Métodos. Las células del epitelio nasal se seleccionaron por morfología. Después, se escogieron las células individuales, descartando dobletes. El *gating* para las poblaciones de Anexina V-/PI- (vivas), Anexina V+/PI- (apoptosis temprana), Anexina V-/PI+ (necrosis) se muestra en la ilustración 13.

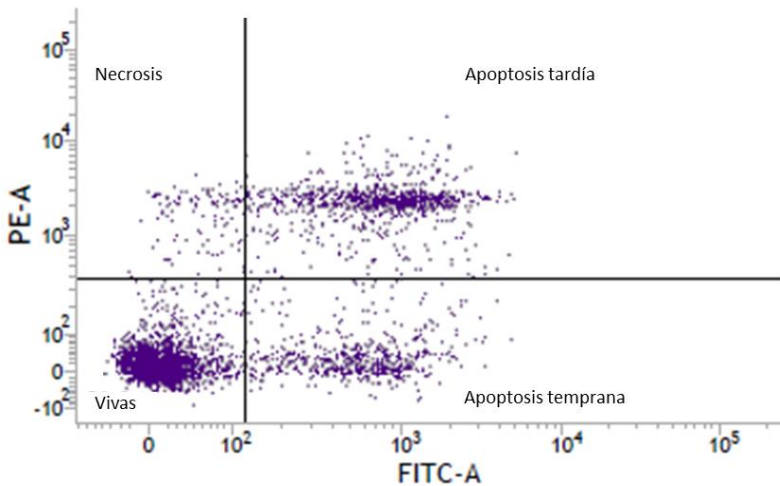


Ilustración 13. *Gating* para las poblaciones de Anexina V-/PI- (vivas), Anexina V+/PI- (apoptosis temprana), Anexina V-/PI+ (necrosis), Anexina V+/PI+ (apoptosis tardía).

4.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha llevado a cabo con los *softwares* GraphPad Prism versión 6.0 para Windows (La Jolla, California, Estados Unidos) y R para Windows (Boston, Massachusetts, Estados Unidos)¹⁶⁹.

En todos los test se ha establecido un nivel de significación estadística, que representa la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando es verdadera, del 5% ($\alpha=0,05$).

4.4.1. Comparación de variables categóricas.

Para el análisis de una **variable categórica**, con dos categorías **entre dos grupos**, se han usado **tablas de contingencia**, una tabla de frecuencias absolutas que recoge cuántos datos se han observado en cada categoría y en cada uno de los grupos. En este trabajo se han utilizado dichas tablas para el análisis del sexo en los grupos de pacientes y de controles. Para analizar las tablas de contingencia, se han utilizado test de homogeneidad aplicando el **test Chi-cuadrado (χ^2)**. En este test, la H_0 indica igualdad de proporciones en los dos grupos, y la H_A que las proporciones no son iguales en ambos grupos. Si en el test

aplicado se obtenía un **p-valor** $< \alpha$, se consideraba que había evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H_0 .

4.4.2. Comparación de las medias de dos poblaciones.

Se han realizado test estadísticos para **comparar** una **variable cuantitativa** entre **dos grupos**, como los formados por pacientes con DCP frente a los controles, y dentro del grupo de pacientes: niños frente a adultos, hombres frente a mujeres, y presencia o ausencia de un síntoma determinado. En este test, la H_0 indica que no hay diferencias entre medias, y la H_A que las medias de la variable estudiada son distintas entre los dos grupos. Si en el test aplicado se obtenía un **p-valor** $< \alpha$, se consideraba que había evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H_0 .

Previa a la elección del test adecuado, se ha comprobado que se cumple la **aleatoriedad** de los datos mediante el **test de rachas**. En este test, la H_0 indica que la muestra es aleatoria, es decir que las observaciones son **independientes**; mientras que la H_A indicaría que no son independientes.

Con la finalidad de elegir el test estadístico adecuado para la realización del contraste de hipótesis, previamente se ha comprobado si había **normalidad** bien en ambos grupos o bien

en la distribución en el muestreo de la media. Para establecer comparaciones entre el grupo de pacientes y el de controles, puesto que ambas muestras tenían un tamaño suficientemente grande ($n > 30$) para aplicar el **Teorema Central del Límite**, se ha asumido normalidad en la distribución en el muestreo de la media. En casos particulares en los que la muestra era de menor tamaño, la normalidad de los grupos se ha estudiado mediante el test de **Shapiro-Wilk**:

- En los casos en los que no se cumplía el supuesto de **normalidad**, el contraste de hipótesis se ha realizado con el test no paramétrico de **Mann-Whitney** para comparar medianas entre dos muestras.
- En los casos en los que se cumplía el supuesto de **normalidad**, se ha contrastado si había **homocedasticidad** o igualdad de varianzas mediante el **test de Levene**:
 - Si se cumplía la hipótesis nula (**igualdad de varianzas**), se ha aplicado el **test t-Student** para dos muestras independientes.
 - Si, por el contrario, había evidencias estadísticas suficientes para rechazar la hipótesis nula, es decir, **no** había **igualdad de varianzas**, se ha aplicado el **test t-Student para varianzas distintas**.

4.4.3. Comparación de más de dos medias: comparaciones múltiples.

Para las **comparaciones** de una variable cuantitativa **entre más de dos grupos** se han realizado contrastes estadísticos para verificar si se cumplía la hipótesis nula (H_0 =no hay diferencias entre los grupos con respecto a la variable estudiada) a partir de nuestros datos, o si había evidencias estadísticas de lo contrario. Con un **p-valor** $< \alpha$ se ha considerado que había evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H_0 . Dichos test se han aplicado para estudiar las diferencias en las variables de interés, entre los pacientes con distintos patrones de movilidad ciliar.

Al igual que con las comparaciones entre dos grupos, para la elección del test estadístico adecuado para la realización del contraste de hipótesis, previamente se ha comprobado que había **independencia** entre las observaciones, es decir, que había **aleatoriedad** en nuestras muestras mediante el **test de rachas**. Además, se ha contrastado si había **normalidad** mediante el test de **Shapiro-Wilk**, ya que en este caso el número de pacientes era menor que 30:

- En los casos en los que no se cumplía el supuesto de **normalidad**, el contraste de hipótesis se ha realizado con el test no paramétrico de **Kruskal-Wallis** para comparar medianas de más de dos poblaciones.

- En los casos en los que sí se cumplía el supuesto de **normalidad**, se ha contrastado si había **homocedasticidad** o igualdad de varianzas mediante el **test de Levene**:
 - Si se cumplía la H_0 (**igualdad de varianzas**), se ha aplicado el **test ANOVA** para comparar medias de más de dos poblaciones.
 - Si por el contrario había evidencias estadísticas suficientes para rechazar la hipótesis nula, es decir, **no** había **igualdad de varianzas**, se ha aplicado el **test de Welch**, o ANOVA para comparar medias de más de dos poblaciones con varianzas distintas.

4.4.4. Correlación entre dos variables continuas.

El coeficiente de correlación se ha utilizado para la búsqueda de posibles relaciones o asociaciones entre variables cuantitativas continuas medidas en individuos de un mismo grupo (en nuestro caso, el grupo de pacientes con DCP).

Para el estudio de la posible relación entre las dos variables numéricas de interés, los datos se han representado en **diagramas de dispersión**. Y para analizar el grado de relación

lineal entre dichas variables, se ha utilizado el **coeficiente de correlación lineal o de Pearson (ρ)**, una medida relativa que no depende de las unidades en las que están medidas las variables, y que toma valores entre -1 y 1. El signo sólo es indicativo del tipo de relación: toma valores positivos cuando la relación es directa, y negativos cuando la relación es inversa, mientras que una correlación de 0 significa que hay ausencia total de relación lineal. En los análisis de correlación, la H_0 significa que no hay relación lineal entre las dos variables. Un **p-valor $< \alpha$** indica que hay evidencias estadísticas suficientes para rechazar la hipótesis nula, y que, por tanto, existe **relación lineal entre las dos variables**.

4.4.5. Árboles de clasificación o decisión

Con el fin de **clasificar** a los individuos del estudio (**pacientes o controles**) basándonos en los valores de determinadas variables medidas en dichos individuos (**parámetros del perfil oxidativo**), se han estudiado distintos **Modelos de Clasificación Multivariada**¹⁷⁰.

En este caso concreto, la **variable dependiente** a predecir es **cualitativa** (grupo de **pacientes y controles**), y el objetivo del modelo es predecir la clasificación que le correspondería a un

individuo nuevo con cierto perfil de valores en las **variables explicativas (cuantitativas continuas)**.

El **Análisis Discriminante** es una de las técnicas más utilizadas en estos tipos de clasificaciones, ya que permite analizar las diferencias entre grupos de individuos previamente definidos mediante una función lineal o cuadrática de las variables. Este análisis posibilita emplear luego esa función para predecir la pertenencia de una nueva observación a uno de los dos grupos. No obstante, el Análisis Discriminante sólo debe aplicarse cuando las variables independientes siguen una distribución normal multivariante y se cumple la igualdad de la matriz de varianzas covarianzas en los grupos (homocedasticidad)¹⁷¹.

Una vez comprobado que las muestras incluidas en este estudio no cumplían dichas condiciones de aplicabilidad, se ha utilizado el **árbol de decisión o clasificación**, que es un método **no paramétrico** alternativo de clasificación¹⁷². Los árboles de clasificación y regresión (CART) son técnicas exploratorias de datos cuyo objetivo fundamental es encontrar reglas clasificatorias y predictivas¹⁷³.

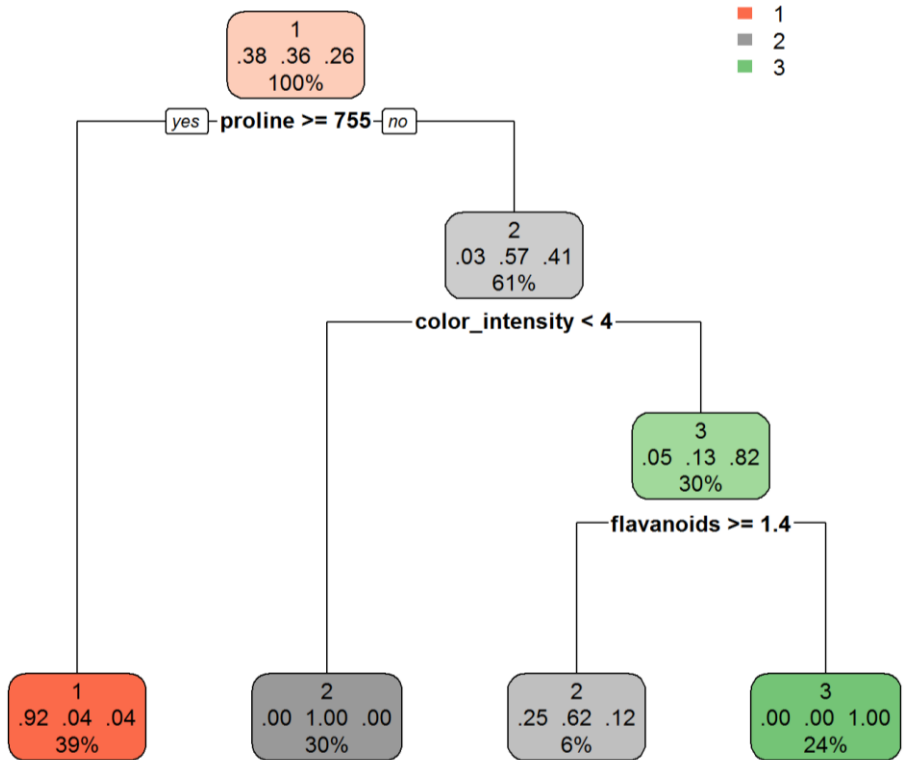


Ilustración 14. Ejemplo de árbol de decisión (Fuente: <https://medium.com/@jboscomendoza/arboles-de-decision-con-r-clasificación-c6c583b16125>; visto el 28 de mayo de 2018).

Los **árboles de decisión tipo CART** (Ilustración 14) están basados en reglas de decisión que van desplegándose en forma de árbol binario. En cada nodo se plantea, para una variable, dos alternativas posibles que se van sucediendo hasta que se llega a la construcción final del árbol. Así, en cada nodo de decisión se comprueba si el valor de dicha variable es mayor o menor que cierto valor específico. Si la premisa no se cumple, se sigue la

rama de la derecha y si se cumple, la de la izquierda. De este modo, cada nodo divide los datos en dos grupos mutuamente excluyentes. Para la selección del árbol óptimo, el programa realiza 3 pasos:

1. Construcción del árbol maximal.
2. Poda del árbol, en la que se eliminan las particiones que menos aportan para explicar la respuesta.
3. Selección del árbol óptimo mediante un procedimiento de validación.

Para analizar la capacidad de predicción del árbol de decisión elegido, se ha dividido la muestra en dos grupos al azar:

- **Muestra de entrenamiento** (70% de los individuos): Es aquella en la que se apoya el programa para construir el árbol óptimo, conociendo *a priori* a qué grupo pertenece cada individuo.
- **Muestra de prueba** (30% de los individuos): Se utiliza *a posteriori* para la validación del modelo, sin saber a qué grupo pertenece cada individuo.

Tras la construcción del árbol óptimo con la “muestra de entrenamiento”, se ha empleado la “muestra de prueba” para la validación del modelo. Para ello, se ha llevado a cabo el **análisis estadístico curva ROC** que permite determinar la **exactitud**

diagnóstica de un test. A partir del árbol óptimo seleccionado, la curva ROC proporciona los valores de **sensibilidad** (probabilidad de clasificar como paciente un individuo que padece la enfermedad) **y especificidad** (probabilidad de dar negativo en un individuo que no padece la enfermedad), así como su **capacidad discriminativa**. La capacidad discriminativa del test se determina mediante el área bajo la curva (**AUC**), que es un indicador de la probabilidad de que ante un par de individuos, uno enfermo y otro sano, la prueba los clasifique correctamente¹⁷⁴.

5. Resultados

5.1. Pacientes

En el estudio han participado 35 pacientes y 35 controles, cuyas características demográficas se incluyen en la tabla 11.

Tabla 11. Datos demográficos de los grupos de pacientes y controles. El sexo se expresa como valores absolutos y como porcentajes de mujeres y hombres. La edad se expresa como media y desviación típica de los años. La última columna muestra el p-valor de los contrastes de hipótesis (Chi-cuadrado para el sexo y t-student para la edad).

| | CONTROLES | PACIENTES | p-valor |
|--|--------------|---------------|---------|
| Número de sujetos | 35 | 35 | - |
| Género (nº hombres / nºmujeres) | 17/18 | 20/15 | 0,6324 |
| (%hombres / % mujeres) | 48,57/51,43% | 57,14/42,86% | |
| Edad (años) | 26,73 ± 9,51 | 27,09 ± 20,12 | 0,2258 |

Vemos que, de los 35 controles incluidos en el estudio, 17 son hombres (48,57%) y 18 son mujeres (51,43%), mientras que en el grupo de pacientes 20 son hombres (57,14%) y 15 mujeres (42,86%) (figura 3a). La media de edad en el grupo de pacientes es de 27,09 años (rango de 0 a 63), mientras que en el grupo control es de 26,73 años (rango de 15 a 60) (figura 3b). Los p-valor de los contrastes de hipótesis, Chi-cuadrado para variables categóricas en el caso del sexo y t-student para comparación de medias de dos muestras en el caso de la edad, indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

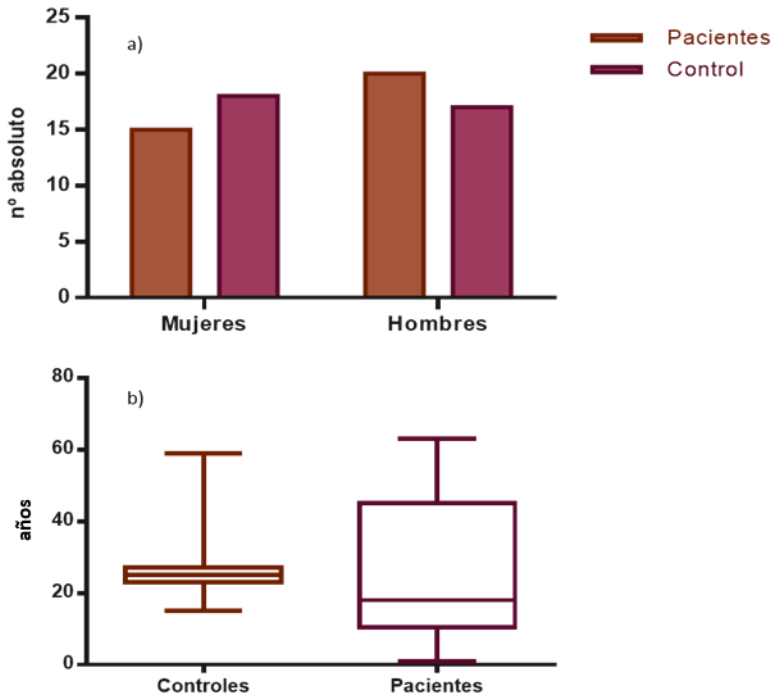


Figura 3. El primer gráfico (3a), es un diagrama de barras que muestra el número de mujeres y hombres incluidos en el grupo de pacientes y en el de controles. El segundo (3b) es un diagrama de cajas que muestra la mediana, Q1, Q3, máximos y mínimos de las edades de los pacientes y controles incluidos en el estudio.

En el grupo de pacientes, se han recogido distintos datos relacionados con la enfermedad, como la edad en el momento del diagnóstico y las manifestaciones clínicas, y los resultados de distintas pruebas diagnósticas. En todos los pacientes incluidos en el estudio se ha valorado el patrón y frecuencia de la movilidad ciliar; en 22 de ellos la ultraestructura de los cilios; y en 20 los niveles de nNO. Éstos datos se incluyen en las tablas 12, 13 y 14.

Tabla 12. Tabla que muestra los datos recogidos de los pacientes. La edad, IMC, edad en el momento del diagnóstico y los niveles de nNO se muestran como media y desviación típica en la primera columna, y los valores máximos y mínimos en la segunda columna. El resto de datos se expresan en valores absolutos en la primera columna y como porcentajes en la segunda columna.

| Características pacientes (n=35) | Valores absolutos o (media \pm SD) | Porcentajes o (max-min) |
|---|--------------------------------------|-------------------------|
| Sexo (hombres / mujeres) | 20/15 | 57,14/42,86% |
| Edad (años) | (27,09 \pm 20,12) | (0-63) |
| Número de niños (0-17 años) | 16 | 45,71% |
| Número de adultos (18-63 años) | 19 | 54,29% |
| IMC (kg/m ²) | (22,53 \pm 5,00) | (15,02-31,61) |
| Edad en el momento del diagnóstico (años) | (19,56 \pm 18,38) | (0-57) |
| <i>Situs inversus</i> | 9 | 25,71% |
| Tos productiva crónica | 31 | 88,57% |
| Bronquiectasias | 15 | 42,86% |
| Atelectasias | 11 | 31,43% |
| Asma | 10 | 28,57% |
| Otitis | 21 | 60,00% |
| Rinosinusitis | 18 | 51,43% |
| Neumonías | 20 | 57,14% |
| Niveles de nNO (ppb) | (741,15 \pm 1332,51) | (5,00-4508,00) |

La tabla 12 recoge el porcentaje de hombres y mujeres dentro del grupo de pacientes con DCP, así como la edad media en el momento de la toma de la muestra. Asimismo, se aprecia que, de los 35 pacientes, 16 eran niños (45,71%) de edades comprendidas entre 0 y 17 años, y 19 adultos (54,29%) de edades entre 18 y 63 años. Vemos que la media del IMC es de 22,53kg/m², y que la media de edad de diagnóstico es de 19,56

años. Además se aprecia, que 9 de los pacientes de nuestra muestra (25,71%) presentan *situs inversus*, 31 (88,57%) tos productiva crónica, 15 (42,86%) bronquiectasias, 11 (31,43%) atelectasias, 18 (51,43%) rinosinusitis crónica, 10 (28,57%) asma de difícil control, 21 (60,00%) otitis recurrentes y 20 (57,14%) neumonías.

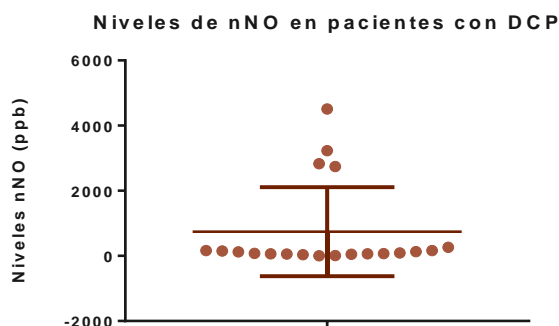


Figura 4. Diagrama de dispersión que muestra los valores de media y desviación típica (SD) de los niveles de nNO (en ppb) en el grupo de pacientes. Los puntos reflejan los valores que toma la variable para cada paciente.

La media de los valores de nNO obtenidos en los pacientes con DCP es de 741,15ppb (rango de 5,00 a 4508,00), cifra anormalmente alta respecto a los habitualmente detectados en esta enfermedad. Sin embargo, estos valores se han visto sesgados por los obtenidos en 4 casos cuyas cifras de nNO son anormalmente altas (figura 4), lo que hace pensar que, de utilizar esta determinación como única prueba diagnóstica, no se hubieran diagnosticado y hubieran supuesto 4 falsos negativos.

Excluyendo estos 4, la media de los valores de nNO obtenidos en el grupo de pacientes con DCP sería de $94,50 \pm 64,50$ ppb, lo que ya concuerda con los valores bajos descritos en este tipo de patología.

Tabla 13. Tabla que muestra el número de pacientes (y porcentaje sobre el total de los 22 en los que se cuenta con ultraestructura), que presentan defectos en ambos brazos, Externos e Internos de Dineína (BED y BID); sólo en los BID; desorganización de los microtúbulos (MT); transposición; déficit parcial de dineína o ultraestructura normal.

| Defectos ultraestructura ciliar (n=22) | Valores absolutos | Porcentajes |
|--|-------------------|-------------|
| BED y BID | 6 | 27,27% |
| BID | 7 | 31,82% |
| Desorganización de MT | 2 | 9,09% |
| Transposición | 1 | 4,55% |
| Déficit parcial de dineína | 3 | 13,64% |
| Normal | 3 | 13,64% |

La tabla 13 muestra que 27,27% de los 22 pacientes con DCP en los que se dispone de su ultraestructura ciliar, presenta pérdida completa de los BED y BID; 31,82% tiene, únicamente, pérdida completa de los BID; 9,09% desorganización de los MT; 4,55% una transposición, y 13,64% un déficit parcial de dineína, mientras que en el 13,64% la ultraestructura ciliar es normal.

En la tabla 14 se recoge el número (y porcentaje del total de los 35 pacientes) con cada una de las alteraciones del patrón o/y frecuencia de batido ciliar encontradas: cilios inmóviles; cilios

con movimiento vibrátil; con amplitud reducida e incoordinación, así como aquellos con patrón normal pero frecuencia de batido reducida.

Tabla 14. Tabla que muestra el número (y porcentaje) del total de pacientes estudiados con sus distintos patrones y frecuencias de batido ciliar.

| Patrón de batida ciliar (n=35) | Valores absolutos | Porcentajes |
|---|-------------------|-------------|
| Cilios inmóviles | 9 | 25,71% |
| Movimiento vibrátil | 11 | 31,43% |
| Amplitud reducida e incoordinación | 9 | 25,71% |
| Patrón normal pero frecuencia reducida | 6 | 17,14% |

5.2. Comparación del perfil oxidativo de las células del epitelio respiratorio nasal entre pacientes y controles

Tras la puesta a punto del análisis del perfil oxidativo en las células del epitelio nasal humano, se incluyeron en el estudio un total de 35 pacientes y 35 controles a los que se les analizaron todos los parámetros explicados en la sección 5.2. La tabla 15 incluye el resumen de las medias y desviaciones típicas para cada

parámetro en los grupos de pacientes y controles, así como el p-valor de las comparaciones entre grupos.

Tabla 15. Tabla que incluye las medias y desviaciones típicas de todos los parámetros de estrés oxidativo medidos en el grupo de pacientes y controles, además de cada p-valor de los contrastes de hipótesis para evaluar las diferencias entre ambos grupos. El estadístico de contraste utilizado en todos los casos, ha sido la t-student, ya que al tener una n >30 en ambos grupos, según el Teorema Central del Límite, se puede asumir normalidad de los datos.

| Parámetro | CONTROLES (n=35) | PACIENTES (n=35) | p-valor |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| Niveles de apoptosis (%) | 20,59 ± 18,97 | 10,01 ± 7,80 | 0,0036 |
| Células vivas (%) | 45,73 ± 16,50 | 72,04 ± 17,36 | <0,0001 |
| Ca ²⁺ intracelular (unidades de fluorescencia arbitrarias (uaf)) | 116,80 ± 53,55 | 111,20 ± 60,27 | 0,6802 |
| Potencial de membrana plasmático (uaf) | 756,70 ± 767,00 | 748,10 ± 534,30 | 0,9566 |
| NO total (uaf) | 132,70 ± 265,60 | 53,66 ± 33,79 | 0,0076 |
| Peróxidos intracelulares (uaf) | 484,90 ± 409,2 | 823,20 ± 841,30 | 0,2057 |
| O ₂ ⁻ total (uaf) | 469,70 ± 406,70 | 273,00 ± 172,90 | 0,0176 |
| ONOO ⁻ total (uaf) | 29,04 ± 16,27 | 18,64 ± 14,24 | 0,0071 |
| H ₂ O ₂ mitocondrial (uaf) | 490,50 ± 237,40 | 270,10 ± 133,1 | <0,0001 |
| O ₂ ⁻ mitocondrial (uaf) | 155,10 ± 108,60 | 74,56 ± 63,04 | 0,0004 |
| Masa mitocondrial (uaf) | 1723,00 ± 947,50 | 2314,00 ± 877,70 | 0,0091 |
| Potencial de membrana mitocondrial (uaf) | 590,50 ± 376,80 | 735,30 ± 536,60 | 0,2000 |
| GSH (uaf) | 1438,00 ± 507,40 | 1463,00 ± 653,70 | 0,8673 |
| Proteínas carboniladas (uaf) | 1694,00 ± 1224,00 | 2147,00 ± 1298,00 | 0,1371 |
| Peroxidación lipídica (uaf) | 189,30 ± 163,70 | 178,90 ± 155,50 | 0,7973 |

5.2.1. Detección de los niveles de apoptosis y muerte celular

En referencia al **número de células vivas**, la media de los porcentajes en el grupo de controles es de 45,73, mientras que en el grupo de pacientes es de 72,04. El p-valor es inferior a 0,0001, lo que aporta una evidencia estadística suficiente para rechazar la H_0 y poder afirmar, por tanto, que los pacientes tienen unos porcentajes de células vivas significativamente mayores que los controles (figura 5).

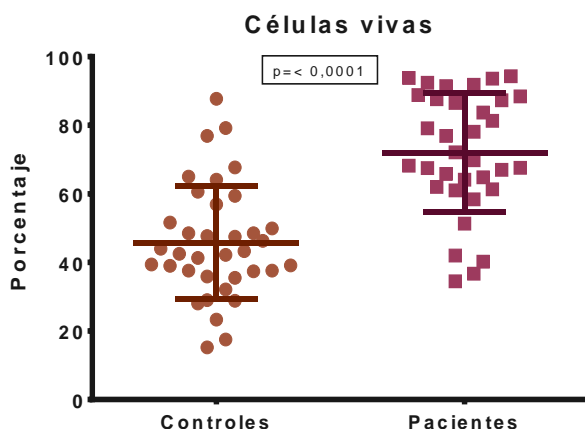


Figura 5. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los porcentajes de células vivas en las muestras de pacientes y controles. Además, se recoge el p-valor obtenido del estadístico de contraste *t-student* que al ser inferior a 0,0001 ($p < \alpha$) indica que hay evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H_0 de igualdad de medias.

En el caso de los **niveles de apoptosis total**, tanto temprana como tardía, la media de los porcentajes en el grupo de controles es de 20,59, mientras que en el grupo de pacientes es de 10,01.

El p-valor resultante del test *t-student* es de 0,0036 ($p < \alpha$), lo que nos indica que los pacientes tienen unos niveles de apoptosis significativamente menores que los controles (figura 6).

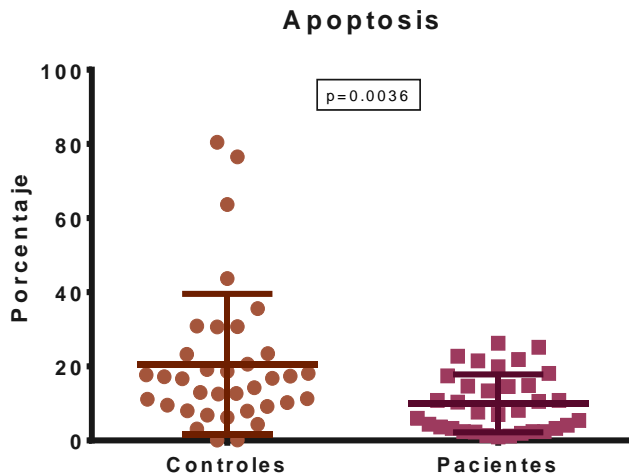


Figura 6. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los porcentajes de células apoptóticas en las muestras de pacientes y controles. Además, se aprecia el p-valor, obtenido del estadístico de contraste *t-student* que, al ser 0,0036 ($p < \alpha$), indica que hay evidencia estadística suficientes para rechazar la H_0 de igualdad de medias.

5.2.2. Medida del potencial de membrana plasmático y de los niveles de Ca^{2+} intracelular

En el caso de los **niveles de Ca^{2+} intracelular**, la media de la intensidad de fluorescencia para el FLUO-4 en el grupo de controles es de 116,80, mientras que en el grupo de pacientes es

de 111,20. El p-valor del test es 0,6802, lo que no tiene evidencia estadística suficiente para rechazar la H_0 de igualdad de medias entre grupos (figura 7).

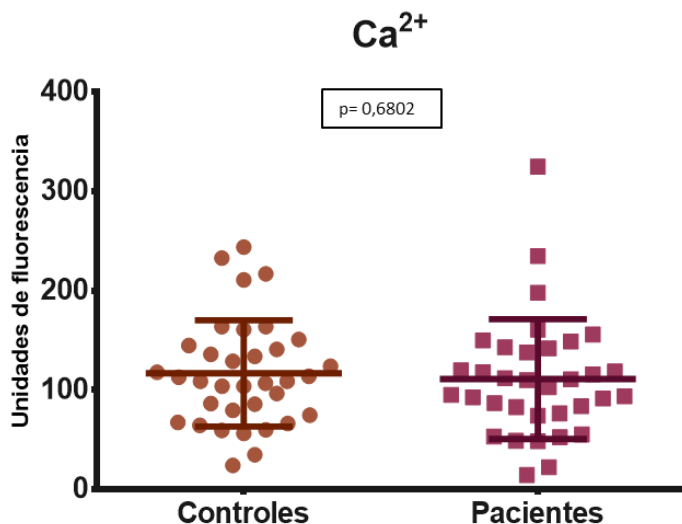


Figura 7. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para FLUO-4 en las muestras de pacientes y controles. El p-valor de 0,6802 indica que no hay evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H_0 de igualdad de medias.

En el caso del **potencial de membrana plasmático**, la media de los niveles de fluorescencia para el DIBAC en el grupo de controles es de 756,70, mientras que en el grupo de pacientes es de 748,10. El p-valor de la prueba *t-student* es de 0,9566 ($p > \alpha$), lo que no aporta evidencia estadística suficiente para rechazar la hipótesis de igualdad de medias entre los grupos (figura 8).

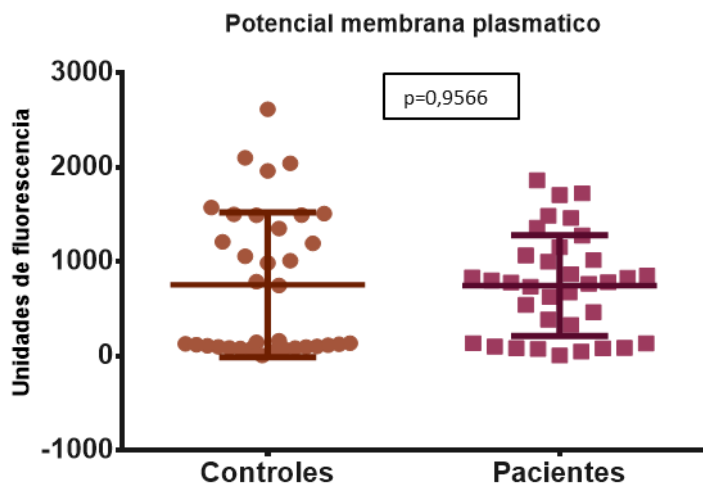


Figura 8. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el DIBAC en las muestras de pacientes y controles. El p-valor de 0,9566 indica que no hay evidencia estadística suficiente para rechazar la H_0 de igualdad de medias

5.2.3. Generación de ERO y ERN

Por lo que respecta a los **niveles de NO total**, los niveles de fluorescencia medios para el DAF son de 132,70 en el caso de los controles, siendo significativamente menores, de 53,66, en el grupo de pacientes. El p-valor del contraste de hipótesis entre los grupos es de 0,0076 ($p < \alpha$), lo que tiene evidencia estadística suficientes para rechazar la H_0 y afirmar, por tanto, que los niveles de NO son significativamente menores en las células del epitelio nasal de los pacientes con DCP (figura 9).

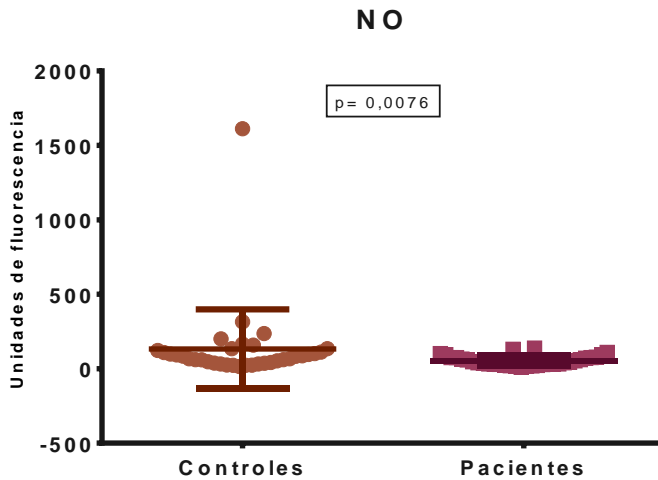


Figura 9. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el DAF en las muestras de pacientes y controles. Además, el p-valor obtenido del estadístico de contraste *t-student*, al ser 0,0076 ($p < \alpha$), indica que hay evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H_0 de igualdad de medias.

En el caso de los **peróxidos intracelulares**, la media de los niveles de fluorescencia para el DCF es de 484,90 en los controles, y de 823,20 en los pacientes. El p-valor de la comparación de medias entre los grupos es de 0,2057 ($p < \alpha$), lo que no aporta evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H_0 y decir que hay diferencias entre los grupos (figura 10).

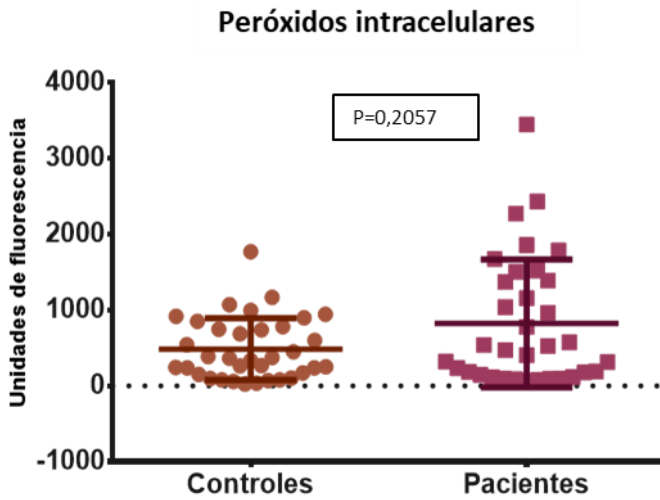


Figura 10. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el DCF en las muestras de pacientes y controles. El p-valor obtenido del estadístico de contraste *t-student*, al ser 0,2057 ($p > \alpha$) indica, que no hay evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H_0 de igualdad de medias.

En referencia a los **niveles de O_2^- total**, la media para la fluorescencia de HE es de 469,70 en el grupo de controles y de 273,00 en el grupo de pacientes. El p-valor del contraste de hipótesis es de 0,0176 ($p < \alpha$), lo que nos permite rechazar la H_0 , es decir que los niveles de O_2^- total en los pacientes son significativamente menores que en los controles (figura 11)

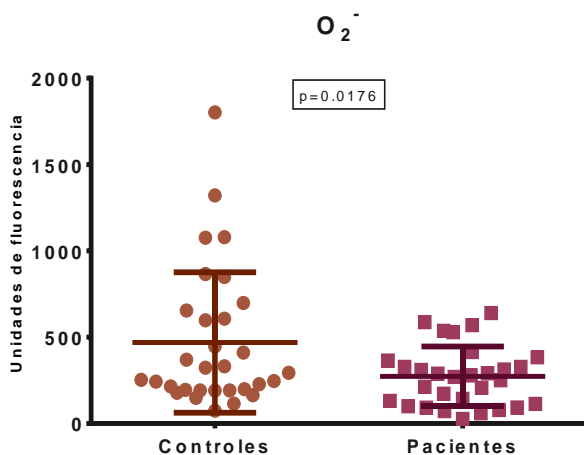


Figura 11. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el HE en las muestras de pacientes y controles. Además, el p-valor obtenido del estadístico de contraste *t-student*, al ser 0,0176 ($p < \alpha$), indica que hay evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H_0 de igualdad de medias.

En cuanto a los **niveles de $ONOO^-$** en la muestra de controles, la media de los valores de fluorescencia para la DHR 1,2,3 es de 29,04, mientras que en la de los pacientes es de 18,64. El p-valor del contraste de hipótesis es de 0,0071 ($p < \alpha$), lo que aporta evidencias estadísticas suficientes para afirmar que los niveles de $ONOO^-$ total en los pacientes son inferiores a los de los controles (figura 12).

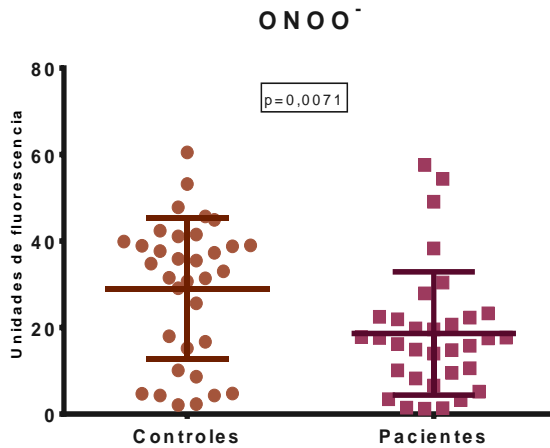


Figura 12. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para la DHR123, en las muestras de pacientes y controles. Además, el p-valor obtenido del estadístico de contraste *t-student*, al ser 0,0071 ($p < \alpha$), indica que hay evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H_0 de igualdad de medias

5.2.4. Función mitocondrial

Por lo que respecta al **análisis de la masa mitocondrial**, los niveles de Mitotracker Green tienen unos valores medios de 1723,00 en los controles, y de 2314,00 en los pacientes. El p-valor de la comparación entre los grupos es de 0,0091 ($p < \alpha$), lo que aporta evidencia estadística suficiente para decir que la masa mitocondrial de los pacientes con DCP es mayor que la de los controles (figura 13).

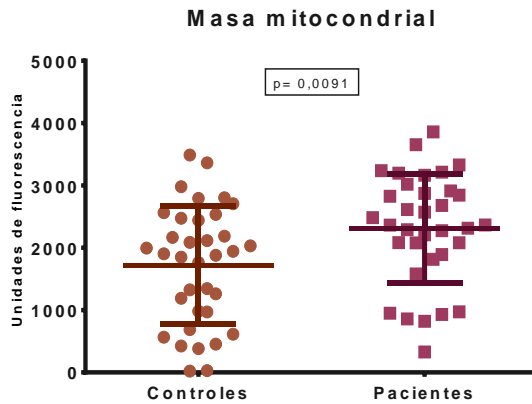


Figura 13. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el Mitotracker Green en las muestras de pacientes y controles. Además, se muestra el p-valor obtenido del estadístico de contraste *t-student* que, al ser 0,0091 ($p < \alpha$), indica que hay evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H_0 de igualdad de medias.

Asimismo, en el análisis del **potencial de membrana mitocondrial**, los niveles medios de fluorescencia para el TMRM son de 735,30 para el grupo de pacientes y de 590,50 para el grupo control. El p-valor del contraste de hipótesis es de 0,2000 ($p > \alpha$), lo que no aporta evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H_0 de igualdad de medias (figura 14).

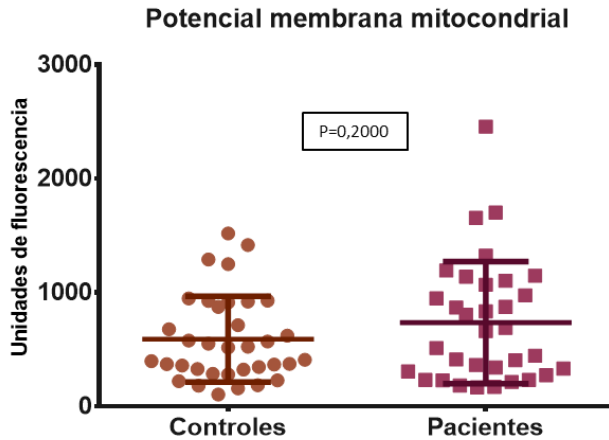


Figura 14. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el TMRM en las muestras de pacientes y controles. El p-valor de 0,2000 indica que no hay evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H_0 de igualdad de medias.

En referencia a los **niveles de O_2^- mitocondrial**, los niveles de fluorescencia medios para el MitoSOX son de 155,10 en el grupo de controles y de 74,56 en el grupo de pacientes. El p-valor del estadístico de contraste es de 0,0004 ($p < \alpha$), lo que tiene evidencia estadística para afirmar que los niveles de O_2^- mitocondrial son menores en el grupo de pacientes que en el de controles (figura 15).

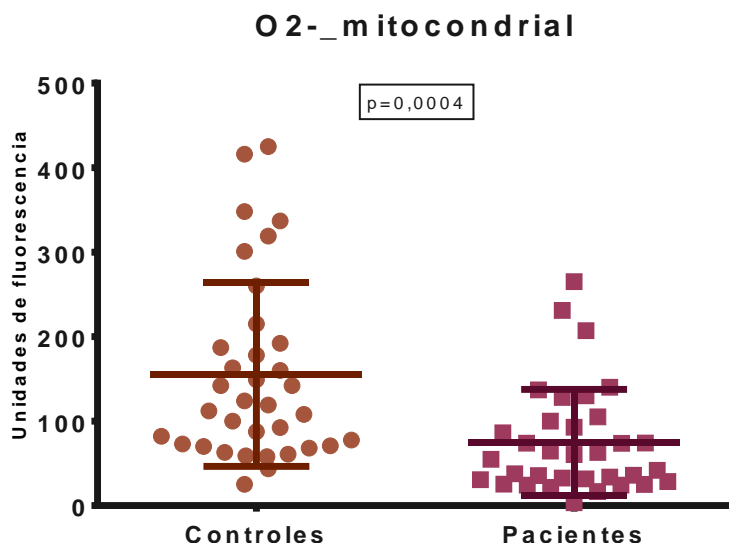


Figura 15. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el MitoSOX en las muestras de pacientes y controles. El p-valor obtenido del estadístico de contraste *t-student*, al ser 0,0004 ($p < \alpha$), indica que hay evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H_0 de igualdad de medias.

Y, por último, en referencia a los **niveles de H_2O_2 específicos de la mitocondria**, los niveles medios de fluorescencia para el MitoPY son de 490,50 en el grupo control, y de 270,10 en el grupo de pacientes. El p-valor de la comparación de medias entre grupos es $<0,0001$ ($p < \alpha$), lo que tiene evidencia estadística suficiente para decir que los pacientes con DCP presentan niveles inferiores de H_2O_2 mitocondrial que los controles sanos (figura 16).

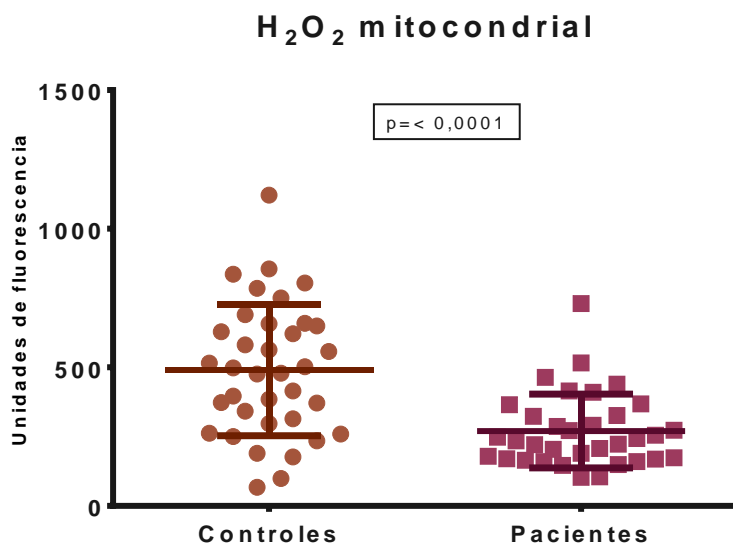


Figura 16. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el MitoSOX en las muestras de pacientes y controles. El p-valor obtenido del estadístico de contraste *t-student*, al ser 0,0004 ($p < \alpha$), indica que hay evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H_0 de igualdad de medias.

5.2.5. Detección de GSH

Referente a los **niveles de GSH**, la media de los valores de fluorescencia para el CMF en el grupo de controles es de 1438,00 y en el de pacientes, de 1463,00. El p-valor del estadístico de contraste es de 0,8673, por lo que no existe evidencia estadística suficiente para rechazar la H_0 de igualdad de medias entre los grupos (figura 17).

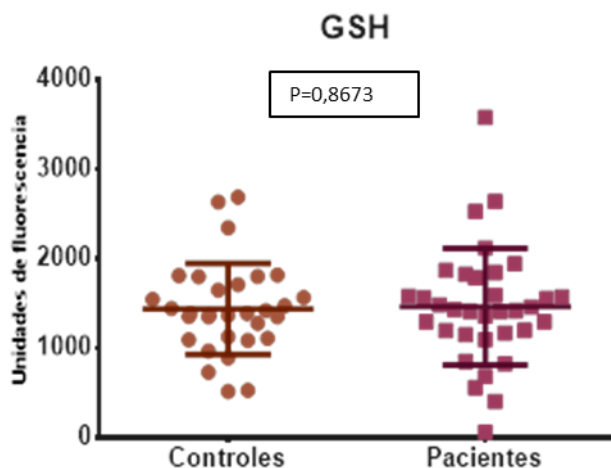


Figura 17. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el CMF en las muestras de pacientes y controles. El p-valor de 0,8673 indica que no hay evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H_0 de igualdad de medias.

5.2.6. Análisis del daño oxidativo sobre proteínas y lípidos

Por último, para el análisis de los productos del daño oxidativo sobre las biomoléculas, se han analizado los niveles de carbonilación proteica, y la ratio entre lípidos oxidados/reducidos en pacientes y controles. En referencia a los **niveles de proteínas carboniladas**, la media de los niveles de fluorescencia para el FTC es de 1694,00 en el grupo control, y de 2147,00 en el grupo de pacientes. El p-valor del contraste de hipótesis es de 0,1371 ($p > \alpha$), por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula de igualdad de medias, y, por tanto, tampoco podemos afirmar que haya diferencias entre los grupos (figura 18).

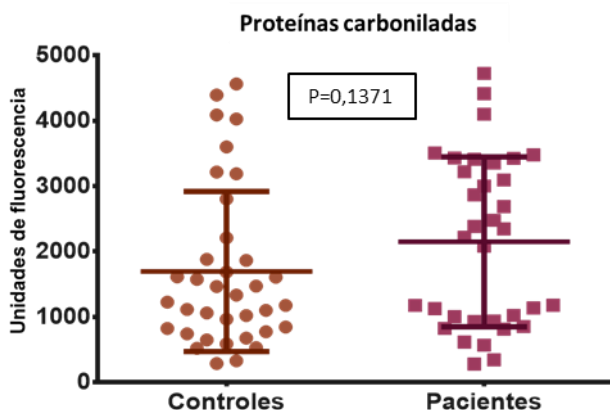


Figura 18. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el FTC en las muestras de pacientes y controles. El p-valor de 0,1371 indica que no hay evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H_0 de igualdad de medias.

Asimismo, las medias de los niveles de fluorescencia para el B665, que reflejan el **daño oxidativo en lípidos**, son de 189,30 en los controles y de 178,90 en los pacientes. El p-valor del estadístico de contraste es de 0,7973, por lo que no podemos rechazar la hipótesis nula de igualdad de medias entre los grupos, y, por tanto, no hay diferencias en cuanto a los niveles de peroxidación lipídica entre pacientes con DCP y controles (figura 19).

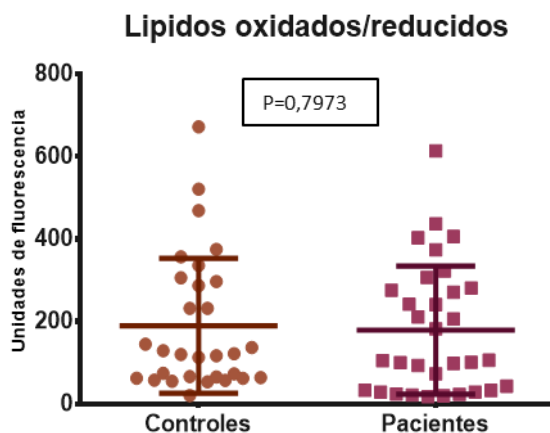


Figura 19. Diagrama de dispersión que muestra los valores de la media y desviación típica de los niveles de fluorescencia para el B665 en las muestras de pacientes y controles. El p-valor de 0,7973 indica que no hay evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H_0 de igualdad de medias.

5.3. Comparación del perfil oxidativo de las células del epitelio respiratorio nasal entre pacientes adultos y niños

Tras el análisis inicial comparativo entre los grupos de pacientes y controles, se ha hecho un análisis más detallado de los resultados de mayor interés. Así, se ha evaluado si dentro del grupo de pacientes con DCP, había diferencias en los parámetros mencionados en función de la edad, niños (de 0 a 17 años) y adultos (de 18 a 63 años). En todos los casos se han evaluado las

condiciones de aplicabilidad, previa elección del test estadístico adecuado (*t-student* se cumplía el supuesto de normalidad, y Mann-Whitney, en caso contrario).

Tabla 16. Tabla resumen que incluye las medias y SD de los porcentajes de apoptosis y niveles de fluorescencia, correspondientes a cada parámetro, en pacientes (adultos y niños). Además, incluye el p-valor del estadístico de contraste aplicado, teniendo en cuenta que se han realizado los siguientes test: *t-student* para las muestras que cumplían normalidad e igualdad de varianzas; *t-student* para varianzas distintas si se cumplía normalidad, pero no homocedasticidad; Mann-Whitney si no había normalidad en alguna de las muestras.

| Parámetro | EDAD | | |
|--|------------------|------------------|---------|
| | NIÑOS (n=16) | ADULTOS (n=19) | p-valor |
| Niveles de apoptosis (%) | 9,85 ± 7,29 | 10,05 ± 8,83 | 0,5270 |
| NO (uaf) | 55,30 ± 36,80 | 55,24 ± 33,10 | 0,7106 |
| Peróxidos intracelulares (uaf) | 709,00 ± 606,84 | 915,34 ± 1006,85 | 0,6374 |
| O₂⁻ total (uaf) | 243,85 ± 123,72 | 288,49 ± 211,82 | 0,5370 |
| H₂O₂ mitocondrial (uaf) | 257,00 ± 97,97 | 283,17 ± 160,75 | 0,8543 |
| O₂⁻ mitocondrial (uaf) | 77,70 ± 63,06 | 74,53 ± 67,50 | 0,2572 |
| Masa mitocondrial (uaf) | 2183,21 ± 771,32 | 2298,17 ± 931,25 | 0,6669 |
| ONOO⁻ total (uaf) | 22,80 ± 15,28 | 15,68 ± 12,95 | 0,1121 |

En la tabla 16 se ve que no hay diferencias estadísticamente significativas (en todos los casos p-valor > α) en ninguno de los parámetros estudiados entre los grupos de niños y adultos.

5.4. Comparación del perfil oxidativo de las células del epitelio nasal entre hombres y mujeres con DCP

Al igual que se ha hecho con la edad, comparando los parámetros en los que se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles, se ha planteado un estudio para ver si dentro del grupo de pacientes con DCP había diferencias entre hombres y mujeres. Para poder elegir el test más adecuado para el contraste de hipótesis, se han evaluado previamente los criterios de aplicabilidad (independencia, normalidad e igualdad de varianzas).

Tabla 17. Tabla resumen que incluye las medias y desviaciones típicas de los porcentajes de apoptosis y niveles de fluorescencia correspondientes a cada parámetro en mujeres y hombres con DCP. Además, se muestra el p-valor del estadístico de contraste aplicado, teniendo en cuenta que se han realizado los siguientes test: *t-student* para las muestras que cumplieran normalidad e igualdad de varianzas; *t-student* para varianzas distintas si se cumplía normalidad, pero no homocedasticidad; Mann-Whitney si no había normalidad en alguna de las muestras.

| Parámetro | SEXO | | p-valor |
|--|-------------------|-------------------|---------------|
| | HOMBRES (n=20) | MUJERES (n=15) | |
| Niveles de apoptosis (%) | 11,46 ± 8,78 | 8,18 ± 6,17 | 0,4633 |
| NO (uaf) | 60,38 ± 31,12 | 45,14 ± 36,15 | 0,0769 |
| Peróxidos intracelulares (uaf) | 550,23 ± 539,18 | 1168,96 ± 1032,17 | 0,0512 |
| O ₂ ⁻ total (uaf) | 299,56 ± 163,63 | 238,18 ± 185,13 | 0,6333 |
| H ₂ O ₂ mitocondrial (uaf) | 305,79 ± 135,60 | 225,00 ± 119,12 | 0,0273 |
| O ₂ ⁻ mitocondrial (uaf) | 87,62 ± 60,22 | 58,02 ± 64,65 | 0,0280 |
| Masa mitocondrial (uaf) | 2370,16 ± 867,94 | 2242,00 ± 915,03 | 0,8911 |
| ONOO ⁻ total (uaf) | 19,52 ± 17,10 | 17,44 ± 9,55 | 0,6794 |

La tabla 17 recoge los resultados obtenidos, pudiendo observar que en la mayoría de los parámetros no hay evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H₀, pues los p-valores de los contrastes e hipótesis son superiores a α .

En el caso concreto del **H₂O₂ mitocondrial** la media de los valores de fluorescencia para el MitoPY es de 305,79 en los varones, y de 225,00 en las mujeres. El p-valor es de 0,0273 (p-valor < α), con lo que existe evidencia estadística suficiente para decir que

los niveles de H_2O_2 mitocondrial son menores en las mujeres que en los hombres con DCP (figura 20).

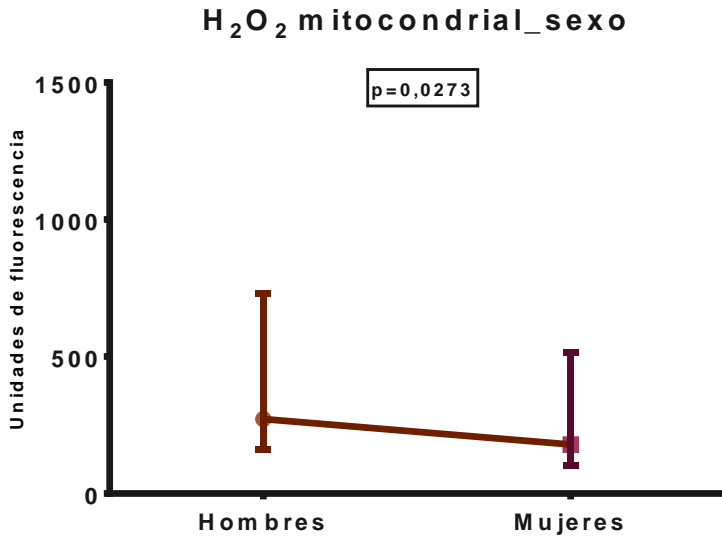


Figura 20. Gráfica de barras que muestra la mediana y rango intercuartílico de los valores de fluorescencia para el MitoPY, en hombres y mujeres con DCP, y permite visualizar que los niveles de H_2O_2 mitocondrial son menores en mujeres que en hombres. Además, se muestra el p-valor del estadístico de contraste ($p\text{-valor} < \alpha$), que permite rechazar la H_0 de igualdad de medianas. En este caso se ha utilizado el test de Mann-Whitney para el contraste de hipótesis, porque los grupos no seguían una distribución normal.

En el caso del O_2^- mitocondrial, la media de los valores de fluorescencia para el MitoSOX es de 87,62 en los hombres, y de 58,02 en las mujeres con DCP. Además, el p-valor es de 0,0280 ($p\text{-valor} < \alpha$), lo que aporta evidencia estadística suficiente para

afirmar que las mujeres tienen menores niveles de O_2^- mitocondrial que los hombres con DCP (figura 21).

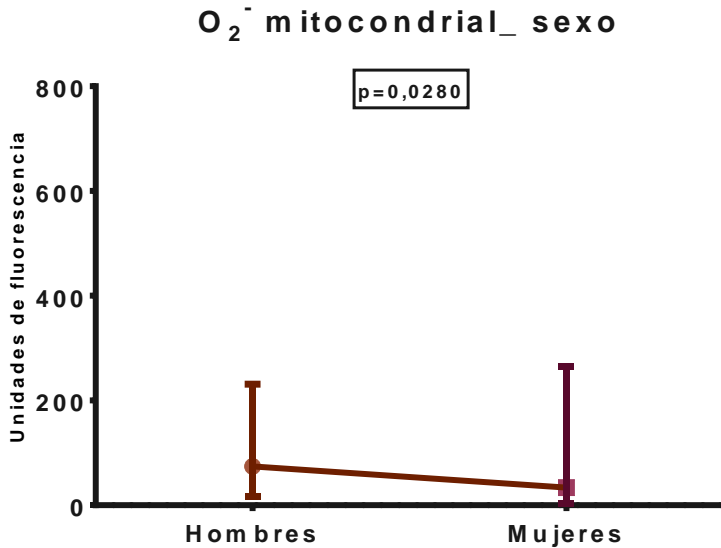


Figura 21. Gráfica de barras que muestra la mediana y rango intercuartílico de los valores de fluorescencia para el MitoSOX en hombres y mujeres con DCP, y permite visualizar que los niveles de O_2^- mitocondrial son menores en mujeres que en hombres. Además, el p-valor del estadístico de contraste ($p\text{-valor} < \alpha$), permite rechazar la H_0 de igualdad de medianas. En este caso se ha utilizado el test de Mann-Whitney para el contraste de hipótesis, porque los grupos no seguían una distribución normal.

5.5. Comparación del perfil oxidativo de las células del epitelio nasal en pacientes con DCP, según su movilidad ciliar

Al igual que se ha hecho con el sexo y la edad, tras el análisis inicial comparativo entre los grupos de pacientes y controles, se ha llevado a cabo un análisis más detallado de los parámetros en los que existían diferencias estadísticamente significativas, en función del patrón y frecuencia de batido ciliar. En todos los casos se han evaluado las condiciones de aplicabilidad, previa elección del test estadístico adecuado (ANOVA si se cumplía el supuesto de normalidad, Welch si había normalidad, pero no homocedasticidad, y Kruskal-Wallis si no cumplían normalidad).

Tabla 18. Tabla resumen que recoge las medias y desviaciones típicas de los porcentajes de apoptosis y niveles de fluorescencia correspondientes a cada parámetro, en pacientes con DCP según su movilidad ciliar. Además, incluye el p-valor del estadístico de contraste aplicado, teniendo en cuenta que se han realizado los siguientes test: ANOVA para las muestras que cumplieran normalidad e igualdad de varianzas; test de Welch si se cumplía normalidad, pero no homocedasticidad; Kruskal-Wallis si no había normalidad en alguna de ellas.

| MOVILIDAD CILIAR | | | | | |
|--|----------------------|------------------------|---|---------------------------|---------|
| Parámetro | Patrón inmóvil (n=9) | Patrón vibrátil (n=11) | Movilidad reducida e incoordinación (n=9) | Frecuencia reducida (n=6) | p-valor |
| Niveles de apoptosis (%) | 10,83 ± 9,27 | 10,80 ± 7,91 | 5,92 ± 5,99 | 10,79 ± 8,69 | 0,531 |
| NO (uaf) | 40,35 ± 23,68 | 64,83 ± 38,39 | 52,46 ± 2,12 | 51,10 ± 48,01 | 0,427 |
| Peróxidos (uaf) | 930,13 ± 1167,67 | 708,91 ± 580,90 | 1102,86 ± 812,54 | 675,02 ± 1001,76 | 0,572 |
| O ₂ ⁻ total (uaf) | 237,20 ± 95,17 | 299,72 ± 199,40 | 188,04 ± 121,35 | 254,58 ± 232,87 | 0,764 |
| H ₂ O ₂ mitocondrial (uaf) | 238,75 ± 92,82 | 276,18 ± 96,19 | 231,57 ± 77,20 | 280,60 ± 193,70 | 0,773 |
| O ₂ ⁻ mitocondrial (uaf) | 57,45 ± 36,73 | 91,92 ± 72,76 | 61,34 ± 33,06 | 59,63 ± 83,49 | 0,355 |
| Masa mitocondrial (uaf) | 2441,38 ± 1025,34 | 2142,00 ± 612,30 | 2403,57 ± 774,83 | 1986,80 ± 1314,24 | 0,762 |
| ONOO ⁻ total (uaf) | 22,05 ± 21,83 | 20,21 ± 12,44 | 10,58 ± 6,85 | 22,58 ± 9,19 | 0,194 |

En la tabla 18 se ve que no hay diferencias estadísticamente significativas (en todos los casos p-valor >α) en ninguno de los parámetros estudiados entre los grupos con distinta movilidad ciliar (figura 22).

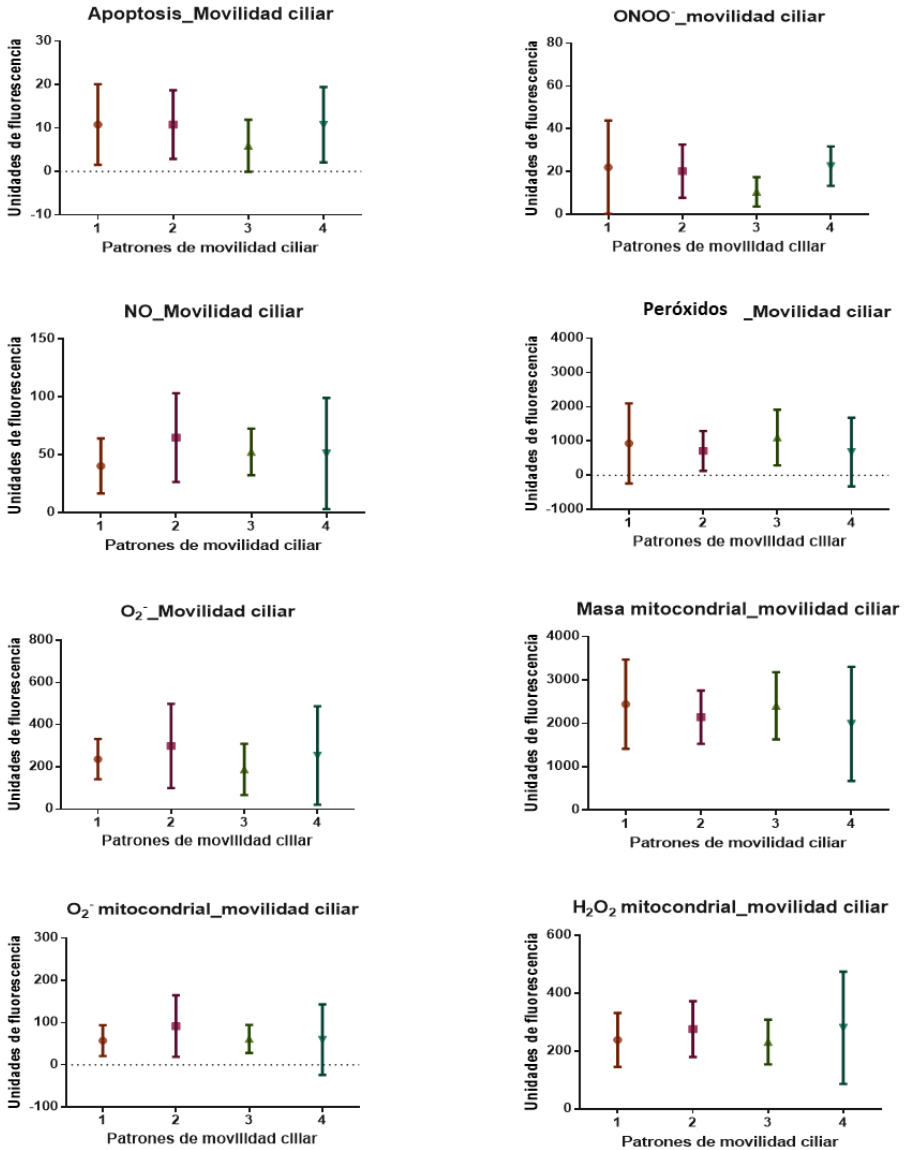


Figura 22. Gráficas de barras que muestran la media y desviación típica de los valores de fluorescencia para el DCF, DAF, HE, DHR123, MitoSOX, Mitotracker Green y MitoPY, y porcentaje de células positivas para la Anexina V, en pacientes con DCP según su movilidad ciliar. Los estadísticos de contraste utilizados para evaluar si había diferencias entre grupos han sido: ANOVA si cumplía normalidad e igualdad de varianzas; Welch si había normalidad, pero no homocedasticidad, y Kruskal-

Wallis si los datos no se ajustaban a una distribución normal. En ningún caso ha habido diferencias estadísticamente significativas entre los grupos

5.6. Comparación del perfil oxidativo de las células del epitelio nasal en pacientes con DCP, según su sintomatología

Tras el análisis de los parámetros de mayor interés, que son los que habían mostrado diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles, según edad, sexo o tipo de movilidad ciliar, también se han planteado contrastes de hipótesis para valorar posibles diferencias en dichos parámetros (niveles de apoptosis, NO, peróxidos, O_2^- total, H_2O_2 mitocondrial, O_2^- mitocondrial, masa mitocondrial y ONOO), en función de las manifestaciones clínicas de los pacientes con DCP.

5.6.1. Otitis recurrentes

Tabla 19. Tabla resumen que muestra las medias y desviaciones típicas de los porcentajes de apoptosis y los niveles de fluorescencia para cada parámetro analizado en pacientes con DCP, con y sin otitis. También se muestran los p-valores de los contrastes de hipótesis utilizados: *t-student* si se cumplía normalidad, y Mann-Whitney si no se cumplía.

| Parámetro | OTITIS | | |
|--|-------------------|------------------|---------|
| | NO (n=14) | SI (n=21) | p-valor |
| Niveles de apoptosis (%) | 12,81 ± 9,18 | 9,35 ± 7,37 | 0,3009 |
| NO (uaf) | 46,63 ± 29,73 | 56,99 ± 34,61 | 0,4619 |
| Peróxidos (uaf) | 774,38 ± 712,40 | 777,20 ± 873,71 | 0,9936 |
| O ₂ ⁻ total (uaf) | 214,43 ± 118,34 | 281,63 ± 188,65 | 0,3671 |
| H ₂ O ₂ mitocondrial (uaf) | 270,38 ± 109,00 | 254,19 ± 107,68 | 0,7212 |
| O ₂ ⁻ mitocondrial (uaf) | 60,73 ± 33,96 | 76,87 ± 68,04 | 0,5297 |
| Masa mitocondrial (uaf) | 1978,75 ± 1104,32 | 2309,38 ± 799,46 | 0,3784 |
| ONOO ⁻ total (uaf) | 24,38 ± 14,68 | 17,79 ± 14,77 | 0,2952 |

En la tabla 19 se muestran las medias de los valores de fluorescencia para los parámetros de interés, y los p-valores de los contrastes de hipótesis para ver si había diferencias entre los grupos de pacientes con DCP que tenían otitis frente a los que no las presentaban. Se observa que todos los p-valores son superiores a α , por lo que en ningún caso se puede rechazar la H_0 y, por tanto, no se puede decir que hayan diferencias entre los grupos.

5.6.2. Asma

Tabla 20. Tabla resumen que muestra las medias y desviaciones típicas de los porcentajes de apoptosis y los niveles de fluorescencia para cada parámetro analizado en pacientes con DCP, con y sin asma de difícil control. También se muestran los p-valores de los contrastes de hipótesis utilizados: *t-student* si se cumplía normalidad, y *Mann-Whitney* si no se cumplía.

| Parámetro | ASMA | | |
|--|------------------|-------------------|---------|
| | NO (n=25) | SI (n=10) | p-valor |
| Niveles de apoptosis (%) | 9,20 ± 7,32 | 10,43 ± 9,36 | 0,6910 |
| NO (uaf) | 58,80 ± 36,90 | 42,38 ± 21,28 | 0,2040 |
| Peróxidos (uaf) | 925,53 ± 880,67 | 689,80 ± 808,08 | 0,4810 |
| O ₂ ⁻ total (uaf) | 272,61 ± 124,81 | 217,04 ± 245,64 | 0,4390 |
| H ₂ O ₂ mitocondrial (uaf) | 270,19 ± 115,20 | 229,80 ± 92,03 | 0,3410 |
| O ₂ ⁻ mitocondrial (uaf) | 76,27 ± 63,89 | 59,65 ± 48,18 | 0,4730 |
| Masa mitocondrial (uaf) | 2340,62 ± 737,74 | 2069,90 ± 1114,07 | 0,4260 |
| ONOO ⁻ total (uaf) | 19,60 ± 13,30 | 18,17 ± 17,62 | 0,8090 |

La tabla 20 muestra las medias de los valores de fluorescencia para los fluorocromos correspondientes, así como de los porcentajes de células positivas para Anexina V. Además, se recogen los p-valores de los contrastes de hipótesis para ver si había diferencias entre los pacientes con DCP que tenían asma de difícil control y los que no la presentaban. Al igual que ocurre con la otitis, todos los p-valores son superiores a α , por lo que en ningún caso se puede rechazar la H_0 y, por tanto, no se puede decir que hay diferencias entre los grupos.

5.6.3. Neumonías de repetición

Tabla 21. Tabla resumen que muestra las medias y desviaciones típicas de los porcentajes de apoptosis y los niveles de fluorescencia para cada parámetro analizado en pacientes afectados de DCP, con y sin neumonía. También se muestran los p-valores de los contrastes de hipótesis utilizados: *t-student* si se cumplía normalidad, y Mann-Whitney si no se cumplía.

| NEUMONÍA | | | |
|--|------------------|------------------|---------|
| Parámetro | NO (n=15) | SI (n=20) | p-valor |
| Niveles de apoptosis (%) | 8,70 ± 8,70 | 10,12 ± 7,53 | 0,6287 |
| NO (uaf) | 45,62 ± 26,07 | 57,84 ± 36,48 | 0,3357 |
| Peróxidos (uaf) | 936,09 ± 1012,18 | 801,86 ± 774,32 | 0,6819 |
| O ₂ ⁻ total (uaf) | 235,64 ± 98,86 | 264,77 ± 186,61 | 0,6863 |
| H ₂ O ₂ mitocondrial (uaf) | 235,82 ± 98,86 | 268,90 ± 114,06 | 0,4256 |
| O ₂ ⁻ mitocondrial (uaf) | 62,28 ± 69,89 | 71,80 ± 54,06 | 0,9114 |
| Masa mitocondrial (uaf) | 2220,09 ± 913,34 | 2271,55 ± 864,24 | 0,8775 |
| ONOO ⁻ total (uaf) | 21,93 ± 18,75 | 17,57 ± 11,52 | 0,4347 |

Al igual que en las tablas anteriores, en la tabla 21 se muestran las medias de los valores de fluorescencia para los parámetros de interés, y se recogen los p-valores de los contrastes de hipótesis para ver si había diferencias entre los pacientes con DCP que tenían neumonías de repetición, y los que no las presentaban. Se observa que todos los p-valores son superiores a α , por lo que en ningún caso se puede rechazar la H_0 y, por tanto, tampoco se puede decir que hayan diferencias entre los grupos.

5.6.4. Atelectasias

Tabla 22. Tabla resumen que muestra las medias y desviaciones típicas de los porcentajes de apoptosis y los niveles de fluorescencia para cada parámetro analizado en pacientes con DCP, con y sin atelectasias. También se muestran los p-valores de los contrastes de hipótesis utilizados: *t-student* si se cumplía normalidad, y Mann-Whitney si no se cumplía.

| ATELECTASIAS | | | |
|--|------------------|------------------|---------------|
| Parámetro | NO (n=24) | SI (n=11) | p-valor |
| Niveles de apoptosis (%) | 12,42 ± 8,84 | 6,52 ± 4,75 | 0,0520 |
| NO (uaf) | 50,28 ± 32,28 | 59,70 ± 36,15 | 0,4720 |
| Peróxidos (uaf) | 519,45 ± 672,60 | 1104,73 ± 661,16 | 0,0125 |
| O ₂ ⁻ total (uaf) | 288,74 ± 189,75 | 198,29 ± 118,48 | 0,1907 |
| H ₂ O ₂ mitocondrial (uaf) | 274,17 ± 118,44 | 233,09 ± 81,97 | 0,3221 |
| O ₂ ⁻ mitocondrial (uaf) | 78,27 ± 72,04 | 62,85 ± 35,06 | 0,5148 |
| Masa mitocondrial (uaf) | 2090,72 ± 994,09 | 2483,36 ± 675,54 | 0,2589 |
| ONOO ⁻ total (uaf) | 20,00 ± 14,74 | 20,35 ± 14,71 | 0,9528 |

En este caso, la tabla 22 muestra las medias y desviaciones estándar de los valores de fluorescencia para los distintos parámetros, y de los porcentajes de apoptosis en los grupos de pacientes con DCP que presentaban, o no, atelectasias. Además, se recogen los p-valores de los contrastes de hipótesis para ver si había diferencias entre los grupos de pacientes con DCP que tenían atelectasias y los que no las presentaban. Se observa que la mayor parte de los p-valores son superiores a 0,05, por lo que no se puede rechazar la H₀ y, por tanto, tampoco se puede decir que haya diferencias entre los grupos. En el caso de los peróxidos intracelulares, medidos con DCF, se aprecia que la media de los

valores de fluorescencia es de 519,45 para los pacientes que no tienen atelectasias, frente a 1104,73 en los pacientes con DCP que sí las presentan. El p-valor del estadístico de contraste es de 0,0125 ($p < \alpha$), por lo que se puede decir que los pacientes con DCP que presentan atelectasias tienen niveles de peróxidos intracelulares significativamente superiores a los de los pacientes que no las presentan (figura 23).

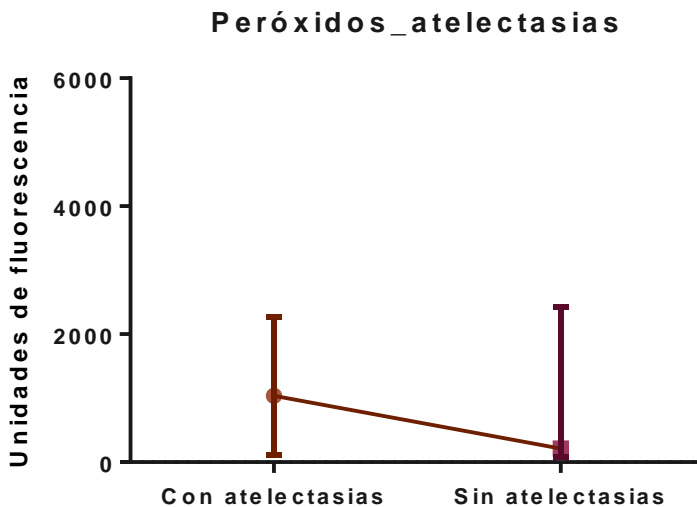


Figura 23. Gráfica de barras que muestra la mediana y rango intercuartílico de los valores de fluorescencia para el DCF, en pacientes con DCP que presentan -o no-atelectasias, y permite visualizar que los niveles peróxidos intracelulares son mayores en los pacientes que tienen atelectasias. Además, el p-valor del estadístico de contraste ($p\text{-valor} < \alpha$), nos permite rechazar la H_0 de igualdad de medianas. En este caso se ha utilizado el test de Mann-Whitney para el contraste de hipótesis, porque los grupos no seguían una distribución normal

5.6.5. Bronquiectasias

Tabla 23. Tabla resumen que muestra las medias y desviaciones típicas de los porcentajes de apoptosis y los niveles de fluorescencia para cada parámetro analizado en pacientes con DCP, con y sin bronquiectasias. También se muestran los p-valores de los contrastes de hipótesis utilizados: *t-student* si se cumplía normalidad, y Mann-Whitney si no se cumplía.

| BRONQUIECTASIAS | | | |
|--|------------------|------------------|---------|
| Parámetro | NO (n=20) | SI (n=15) | p-valor |
| Niveles de apoptosis (%) | 11,23 ± 7,21 | 9,66 ± 8,93 | 0,6165 |
| NO (uaf) | 58,88 ± 38,58 | 51,23 ± 29,78 | 0,5599 |
| Peróxidos (uaf) | 668,92 ± 578,93 | 842,01 ± 838,33 | 0,5370 |
| O ₂ ⁻ total (uaf) | 248,91 ± 129,24 | 272,16 ± 203,64 | 0,4174 |
| H ₂ O ₂ mitocondrial (uaf) | 251,69 ± 97,43 | 264,80 ± 120,14 | 0,7562 |
| O ₂ ⁻ mitocondrial (uaf) | 84,18 ± 66,16 | 65,02 ± 56,86 | 0,4174 |
| Masa mitocondrial (uaf) | 2091,54 ± 748,06 | 2273,73 ± 978,26 | 0,5893 |
| ONOO ⁻ total (uaf) | 20,45 ± 11,89 | 21,17 ± 16,58 | 0,8981 |

La tabla 23 muestra las medias de los valores de fluorescencia para los fluorocromos correspondientes, así como las de los porcentajes de células positivas para Anexina V. Además, se recogen los p-valores de los contrastes de hipótesis para ver si había diferencias entre los pacientes con DCP que presentaban bronquiectasias y los que no las tenían. Vemos que todos los p-valores son superiores a α , por lo que en ningún caso se puede rechazar la H_0 , y, por tanto, no se puede decir que hayan diferencias entre los grupos.

5.6.6. Rinosinusitis crónica

Tabla 24. Tabla resumen que muestra las medias y desviaciones típicas de los porcentajes de apoptosis y los niveles de fluorescencia para cada parámetro analizado en pacientes con DCP, con y sin rinosinusitis. También se muestran los p-valores de los contrastes de hipótesis utilizados: *t-student* si se cumplía normalidad, y Mann-Whitney si no se cumplía.

| RINOSINUSITIS | | | |
|--|------------------|------------------|---------------|
| Parámetro | NO (n=17) | SI (n=18) | p-valor |
| Niveles de apoptosis (%) | 12,02 ± 8,99 | 8,70 ± 7,05 | 0,2661 |
| NO (uaf) | 61,48 ± 36,72 | 46,85 ± 30,84 | 0,2482 |
| Peróxidos (uaf) | 623,00 ± 624,37 | 970,62 ± 979,44 | 0,2861 |
| O ₂ ⁻ total (uaf) | 283,24 ± 154,63 | 228,85 ± 182,85 | 0,4254 |
| H ₂ O ₂ mitocondrial (uaf) | 279,17 ± 93,70 | 236,33 ± 116,37 | 0,2965 |
| O ₂ ⁻ mitocondrial (uaf) | 89,90 ± 67,30 | 58,09 ± 52,75 | 0,1584 |
| Masa mitocondrial (uaf) | 2134,17 ± 856,91 | 2312,72 ± 911,09 | 0,5947 |
| ONOO ⁻ total (uaf) | 27,30 ± 17,01 | 14,08 ± 9,68 | 0,0129 |

En este caso, la tabla 24 muestra las medias y desviaciones estándar de los valores de fluorescencia para los distintos parámetros, y de los porcentajes de apoptosis en los pacientes con DCP que sufren rinosinusitis crónica, y los que no la presentan. Además, se recogen los p-valores de los contrastes de hipótesis para ver si había diferencias entre los grupos. Se aprecia que la mayor parte de los p-valores son superiores a α , por lo que no se puede rechazar la H_0 y, por tanto, no se puede decir que hayan diferencias entre los grupos. En el caso de la generación de niveles de ONOO⁻ total, medido con DHR123, se aprecia que la media de los valores de fluorescencia es de 27,30

para los pacientes que no tienen rinosinusitis, frente a 14,08 en los pacientes con DCP que presentan rinosinusitis. El p-valor del estadístico de contraste es de 0,0129 ($p < \alpha$), por lo que se puede decir que los pacientes con DCP que presentan rinosinusitis tienen niveles de ONOO^- significativamente inferiores a los de los pacientes que no tienen rinosinusitis (figura 24).

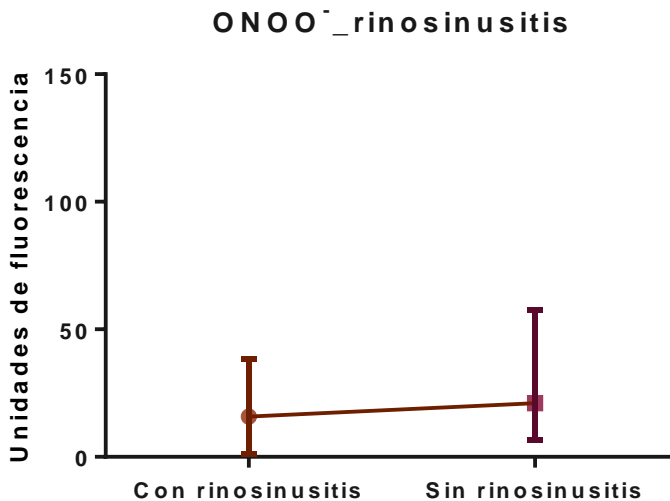


Figura 24. Gráfica de barras que muestra la mediana y rango intercuartílico de los valores de fluorescencia para la DHR123 en pacientes con DCP que presentan, o no, rinosinusitis, y permite visualizar que los niveles ONOO^- son menores en los pacientes que tienen rinosinusitis. Además, el p-valor del estadístico de contraste ($p\text{-valor} < \alpha$), permite rechazar la H_0 de igualdad de medianas. En este caso se ha utilizado el test de Mann-Whitney para el contraste de hipótesis, porque los grupos no seguían una distribución normal.

5.6.7. Situs inversus

Tabla 25. Tabla resumen que muestra las medias y desviaciones típicas de los porcentajes de apoptosis y los niveles de fluorescencia para cada parámetro analizado en pacientes con DCP, con y sin *situs inversus*. También se muestran los p-valores de los contrastes de hipótesis utilizados: *t-student* si se cumplía normalidad, y Mann-Whitney si no se cumplía.

| SITUS INVERSUS | | | |
|--|------------------|------------------|---------------|
| Parámetro | NO (n=26) | SI (n=9) | p-valor |
| Niveles de apoptosis (%) | 11,26 ± 4,87 | 5,31 ± 4,87 | 0,0532 |
| NO (uaf) | 55,58 ± 35,97 | 47,54 ± 24,76 | 0,5645 |
| Peróxidos (uaf) | 681,44 ± 844,97 | 1332,63 ± 711,20 | 0,0338 |
| O ₂ ⁻ total (uaf) | 262,64 ± 18,88 | 237,59 ± 99,04 | 0,7390 |
| H ₂ O ₂ mitocondrial (uaf) | 260,83 ± 114,01 | 247,88 ± 96,97 | 0,7838 |
| O ₂ ⁻ mitocondrial (uaf) | 73,86 ± 66,02 | 62,45 ± 33,25 | 0,6455 |
| Masa mitocondrial (uaf) | 2213,87 ± 916,93 | 2366,63 ± 748,02 | 0,6752 |
| ONOO ⁻ total (uaf) | 19,63 ± 13,88 | 17,68 ± 17,21 | 0,7604 |

En la tabla 25 se muestran las medias y desviaciones estándar de los valores de fluorescencia para los distintos parámetros, y de los porcentajes de apoptosis en los grupos de pacientes con DCP que presentan, o no, *situs inversus*. Además, se recogen los p-valores de los contrastes de hipótesis para ver si había diferencias entre los grupos. Se aprecia que la mayor parte de los p-valores son superiores a α , por lo que no se puede rechazar la H_0 y, por tanto, tampoco se puede decir que existan diferencias entre los grupos. Respecto a los niveles de peróxidos intracelulares en general, medidos con DCF, se aprecia una

media de valores de fluorescencia de 681,44 para los pacientes que no tienen *situs inversus*, frente a 1332,63 en los pacientes con DCP y *situs*. El p-valor es de 0,0338 ($p < \alpha$), por lo que se puede decir que los pacientes con DCP y *situs inversus* tienen niveles de peróxido intracelulares significativamente superiores a los de los pacientes que no tienen *situs inversus* (figura 25).

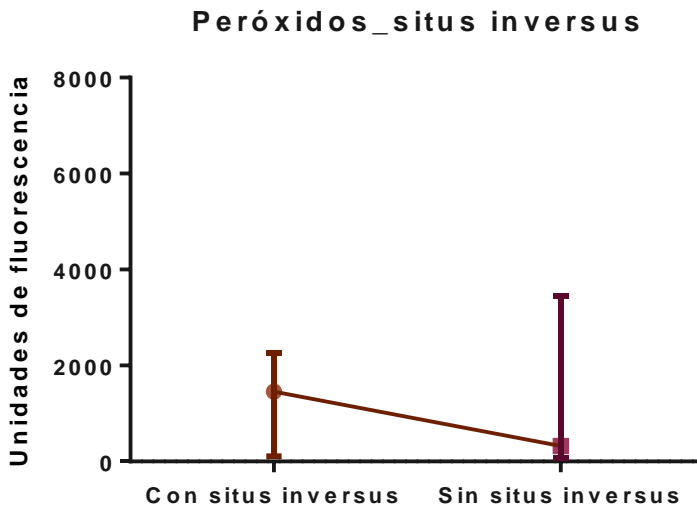


Figura 25. Gráfica de barras que muestra la mediana y rango intercuartílico de los valores de fluorescencia para el DCF, en pacientes con DCP que presentan o no *situs inversus*, y permite visualizar que los niveles de peróxidos intracelulares son mayores en los pacientes que tienen *situs inversus*. Además, el p-valor del estadístico de contraste ($p < \alpha$), permite rechazar la H_0 de igualdad de medianas. En este caso se ha utilizado el test de Mann-Whitney para el contraste de hipótesis, porque los grupos no seguían una distribución normal.

5.7. Análisis de la correlación entre las variables cuantitativas estudiadas en el grupo de pacientes con DCP

Tras la realización de los contrastes de hipótesis para ver si había diferencias en los parámetros de estrés oxidativo entre los grupos de pacientes y controles, se ha visto que los pacientes con DCP tienen niveles más bajos de NO, O_2^- y ONOO⁻ total, H_2O_2 mitocondrial y O_2^- mitocondrial, y menores niveles de apoptosis que los controles sanos. A la vista de los resultados, se han buscado posibles correlaciones entre las variables cuantitativas continuas mencionadas, así como entre éstas y, el IMC de los pacientes y los niveles de nNO. Los resultados de la matriz de correlaciones se recogen en el Anexo 6.

En la parte de debajo de la matriz se muestran los diagramas de dispersión que permiten visualizar la posible relación entre las dos variables comparadas. Para el análisis del grado de relación lineal entre las variables, se ha utilizado el coeficiente de correlación que aparece en la mitad superior de la matriz. Junto a los coeficientes de correlación, en algunos casos se ponen asteriscos, que indican que el p-valor del análisis concreto ha

sido inferior a α , lo que permite rechazar la H_0 , y afirmar, por tanto, que hay una relación lineal entre las variables que se están contrastando.

Se ha visto que no existe correlación entre el IMC y ninguna de las variables estudiadas. En referencia al nNO, únicamente se ha encontrado una correlación positiva con los niveles de apoptosis ($\rho=0,42$). Y, en cuanto al ONOO⁻ total, tampoco presenta correlación con ninguna variable.

El resto de variables se encuentran más relacionadas entre sí, mostrando que los pacientes con mayores niveles de H₂O₂ mitocondrial y O₂⁻ mitocondrial, tienen mayores niveles de apoptosis (ρ de 0,46 y 0,44 respectivamente). Del mismo modo, los pacientes que presentan mayores niveles de NO y O₂⁻ total, también presentan mayores niveles de apoptosis (ρ de 0,36 y 0,54 respectivamente).

Así mismo, los pacientes que tienen niveles más elevados de H₂O₂ mitocondrial, muestran mayores niveles de O₂⁻ mitocondrial, NO y O₂⁻ total (ρ de 0,64; 0,61 y 0,53 respectivamente). Igualmente, los pacientes con niveles más elevados de O₂⁻ mitocondrial, tienen niveles más altos de NO y O₂⁻ total, aunque las correlaciones son más débiles (ρ de 0,49 y 0,47 respectivamente). Y a su vez, los que presentan mayores niveles de NO, tienen niveles más elevados de O₂⁻ total ($\rho = 0,49$).

Por último, se han incluido los niveles de carbonilación proteica y peroxidación lipídica en la matriz de correlaciones, para ver si alguna de las variables anteriormente mencionadas se correlacionaba con el daño oxidativo sobre las biomoléculas. Se ha encontrado que los niveles de NO están directamente correlacionados con ambos (ρ de 0,56 respecto a la peroxidación lipídica, y de 0,43 con los niveles de carbonilación de proteínas). A su vez, los pacientes que presentan mayores niveles de carbonilación de proteínas, también presentan mayores niveles de peroxidación lipídica (ρ de 0,55).

5.8. Árbol de clasificación como pacientes o controles según los parámetros de estrés oxidativo

Por último, se ha creado un árbol de decisión tipo CART que permite clasificar a los individuos participantes en el estudio en los grupos de pacientes o controles, usando como criterios clasificatorios los valores de ciertos parámetros del perfil oxidativo medidos en sus células del epitelio nasal (Figura 26). Para la interpretación del árbol es importante tener en cuenta lo siguiente:

- En cada nodo del árbol se especifica si los integrantes pertenecen al grupo de pacientes o al de controles.
- También se muestra en cada caso la probabilidad (en tanto por 1) de pertenecer al grupo control: se considera 1 en el caso de grupos con probabilidad del 100% de pertenecer al grupo control; y 0 en el caso de grupos con 100% de probabilidad de ser del grupo de pacientes (0% de ser del grupo control).
- Y, por último, se muestra el porcentaje de individuos que pertenecen a cada grupo definido.
- Además, aparecen las variables seleccionadas para el modelo óptimo que mejor definen los grupos finales y los valores de corte que se han determinado para la toma de decisión. De acuerdo a la estructura jerárquica del árbol de clasificación elegido, se puede decir que las variables que mejor definen a los grupos de estudio, en orden de importancia, son: ONOO⁻, niveles de carbonilación de proteínas y O₂-mitocondrial, potencial de membrana plasmático, y peróxidos intracelulares medidos con DAF.

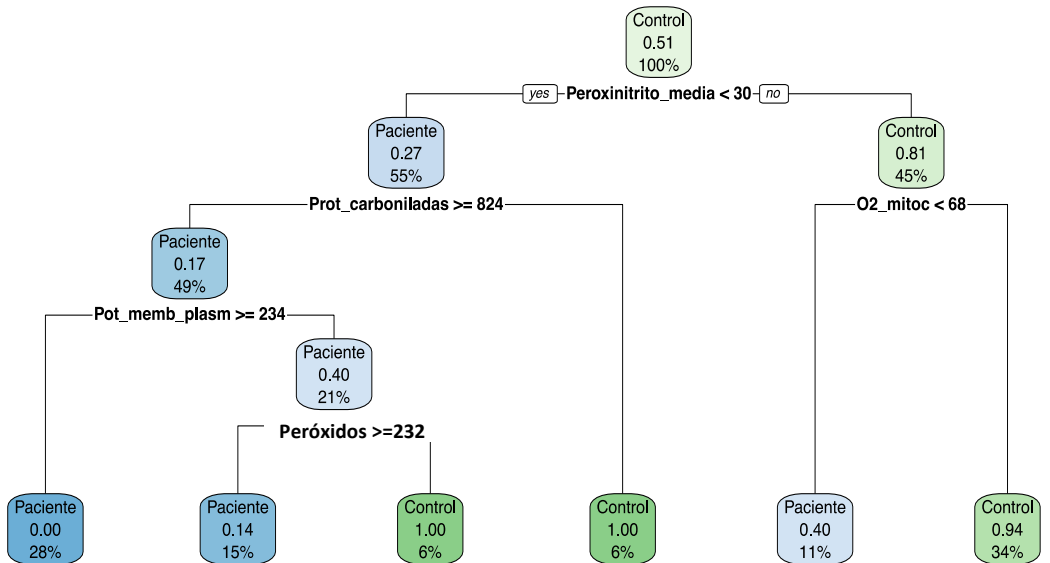


Figura 26. Árbol de decisión tipo CART para la clasificación de los individuos en grupos de pacientes o controles usando, como criterios clasificatorios, ciertas variables del perfil oxidativo de sus células epiteliales.

A la vista de los resultados obtenidos (figura 26), el árbol óptimo permite caracterizar los siguientes grupos de individuos de acuerdo al perfil de estrés oxidativo de sus células epiteliales:

- El primer grupo de sujetos, que constituye el 6% de la muestra con una probabilidad del 100% de ser clasificados como controles son los que tienen las características siguientes:
 - $\text{ONOO}^- < 30$ uaf.
 - Carbonilación de proteínas ≥ 824 uaf.
 - Potencial de membrana plasmático < 234 uaf.

- Peróxidos medidos con DCF < 232 uaf.

- El segundo grupo de sujetos, que constituye el 6% de la muestra con una probabilidad del 100% de ser clasificados como controles son los que tienen las siguientes características:
 - $\text{ONOO}^- < 30$ uaf.
 - Carbonilación de proteínas < 824 uaf.

- Y el tercer grupo de sujetos, que constituye un 34% de la muestra con alta probabilidad (94%) de ser clasificados como controles son los que tienen las siguientes características:
 - $\text{ONOO}^- \geq 30$ uaf.
 - O_2^- mitocondrial ≥ 68 uaf.

- El primer grupo de sujetos, que constituye el 28% de la muestra con una probabilidad del 100% de ser clasificados como pacientes son aquellos con:
 - $\text{ONOO}^- < 30$ uaf
 - Carbonilación de proteínas ≥ 824 uaf
 - Potencial de membrana plasmático ≥ 234 uaf.

- El segundo grupo de sujetos, que constituye un 15% de la muestra con alta probabilidad (86%) de ser clasificados como pacientes son aquellos con:
 - $\text{ONOO}^- < 30$ uaf

- Carbonilación de proteínas ≥ 824 uaf
- Potencial de membrana < 234 uaf.
- Peróxidos medidos con DCF ≥ 232 uaf.
- Y el tercer grupo de sujetos con una probabilidad del 60% de ser clasificados como pacientes, que constituyen un 11% de la muestra son aquellos con:
 - $\text{ONOO}^- \geq 30$ uaf
 - O_2^- mitocondrial < 68 uaf.

Para determinar la capacidad diagnóstica del test, se ha evaluado el mismo en la muestra de prueba. Se ha realizado un análisis curva ROC (Figura 27) para determinar la exactitud diagnóstica del árbol de decisión, así como la sensibilidad y especificidad del test.

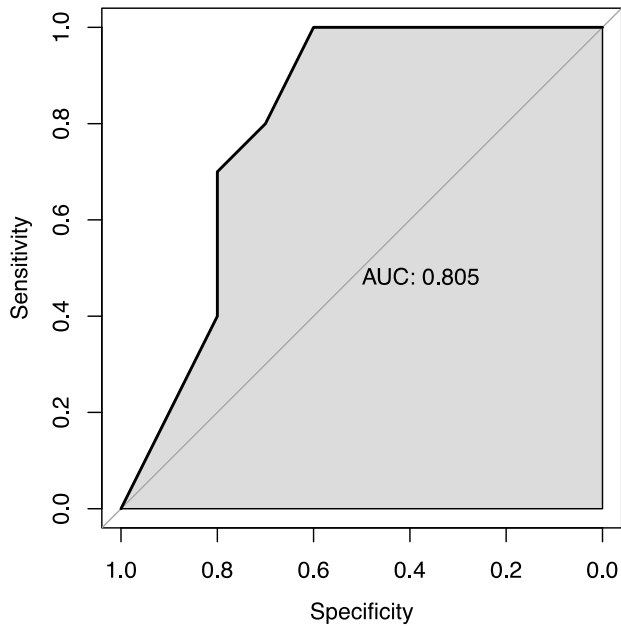


Figura 27. Curva ROC para la determinación de la sensibilidad, especificidad y exactitud diagnóstica del árbol de decisión.

En la Figura 27 se observa que se trata de un test diagnóstico con una capacidad discriminativa buena, pues tiene un área bajo la curva (AUC) de 0,805; una sensibilidad diagnóstica del 71%, y una especificidad del 82%.

6. Discusión

En este trabajo se describen los distintos parámetros relacionados con el perfil oxidativo de las células del epitelio nasal de controles sanos y pacientes con DCP, con el objetivo de identificar sus posibles implicaciones en la fisiopatología de la enfermedad. A su vez, se detallan las características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio para ver si pudiera existir relación entre alguno de los parámetros de estrés oxidativo estudiados y cualquiera de las manifestaciones clínicas propias de la enfermedad. Por último, y con el fin de contribuir a facilitar el diagnóstico de la DCP, se ha desarrollado un árbol de decisión para poder discriminar a nuevos individuos como pacientes o controles, en función de algunos parámetros del perfil oxidativo en sus células del epitelio nasal.

6.1. Consideraciones generales de la muestra

Uno de los principales problemas que se plantean en los estudios dedicados a enfermedades raras, es conseguir que se incluya a un número suficiente de pacientes para que los tests realizados tengan poder estadístico. En este estudio, a pesar de la baja prevalencia de la DCP en la población (estimada en $1/20.000^{15}$), se ha logrado incluir a 35 pacientes y 35 controles. Se trata un

tamaño muestral adecuado para permitir que los test aplicados tengan poder estadístico suficiente para inferir sobre la población en general.

Tras hacer los contrastes correspondientes se ha visto que no hay diferencias significativas respecto a la edad y al sexo entre los dos grupos.

En el grupo de pacientes, predominan discretamente los adultos (> de 18 años) con un 54,29%, sobre los niños (0-17 años de edad) con un 45,71%. El valor medio del IMC, uno de los parámetros recogidos en nuestros pacientes por su posible influencia en el estrés oxidativo¹⁷⁵, se encuentra en el rango de normalidad (22,53kg/m², inferior a 30 kg/m²)¹⁷⁶, y no se ha correlacionado con ninguno de los parámetros de EO evaluados (Anexo 6).

La edad media en el momento del diagnóstico de DCP fue a los 19,56 años, lo que llama extraordinariamente la atención, por su llamativo retraso respecto a las medias europea (5,3 años) y española (6,1 años)¹⁸. Probablemente ésto es debido a que las medias de edad citadas se extrajeron de un amplio estudio multicéntrico que englobaba sólo a pacientes pediátricos, con lo que lógicamente- el diagnóstico tenía que haber sido hecho antes de los 18 años de edad, fecha límite de su inclusión en ese estudio¹⁸. En nuestra serie, como ya se ha comentado, el número

de adultos incluidos (19) supera al de los niños (16) y es conocido que, en la edad adulta, el diagnóstico de la enfermedad empieza a establecerse ante la presencia de bronquiectasias, o ante casos de infertilidad, fundamentalmente en el varón. Los pacientes adultos de nuestro estudio proceden del servicio de Otorrinolaringología del HGUV, Centro de Referencia para el diagnóstico de DCP, al que se remiten pacientes con esta sospecha clínica desde toda España para realizar las pruebas diagnósticas específicas que lo corroboren. Cuando se trata de enfermedades raras el conocimiento de la enfermedad por el colectivo médico del centro de origen es determinante y, en este caso, se demuestra que queda mucho camino por recorrer en la formación del personal sanitario en este campo que, en el caso de la DCP se ve agravado al contar sólo en España con dos centros diagnósticos de esta enfermedad. Respecto a los pacientes pediátricos incluidos en el estudio, la mayoría procedentes de la Unidad de Neumología Pediátrica del HCUV, la edad media al diagnóstico fue de 4,53 años, mostrando se había hecho a edades mas tempranas, similares las europeas.

Otro dato que puede llamar la atención en nuestra muestra de pacientes es que sólo 25,71% de los individuos incluidos en el estudio presentan *situs inversus*, cuando la media europea con esta característica es del 44%¹⁸. Probablemente esto se debió a que la inclusión se hizo aleatoriamente, hasta alcanzar la cifra de

los 35 aceptados, a medida que los pacientes acudían -para su seguimiento- a las consultas de ORL o de neumología infantil, y no partiendo del cupo total de casos diagnosticados por nuestro Grupo, al no ser todos de nuestra zona geográfica y, por ello, no tan accesibles. En su conjunto, en una publicación de nuestro grupo en el año 2013, de los 72 pacientes entonces reseñados, 38,3% portaban un *situs inversus*, lo que se acerca más a la media europea¹⁷⁷.

Respecto al resto de síntomas de la enfermedad, aunque las cifras recogidas en distintas publicaciones difieren entre sí, en función de la especialidad de los autores del estudio que los recoge (ORL, pediatras, neumólogos...), en general, todos coinciden en la reiteración de la mayor parte de síntomas tabulados en esta tesis. La tos productiva crónica se da en el 88,57% de nuestros pacientes, con una prevalencia similar a la publicada por Behan *et al.* y Hossie *et al.*, 2014^{38,178}. La presencia de bronquiectasias (en el 42,86%), es también semejante a los porcentajes presentados en otros trabajos^{179,180}, aunque superior al 29,30% al publicado por Behan *et al.*³⁸, probablemente porque en este estudio predominan los niños sobre los adultos. En el 31,43% de los individuos afectados se detectan atelectasias, porcentaje superior al 20% descrito por Dettmer *et al.*¹⁸¹; en el 28,57%, asma de difícil control, coincidente con Busquets *et al.*¹⁸²; 60% presentan otitis, dato

similar a los publicados por Behan *et al.*, Íñiguez *et al.*, Oktem *et al.* y Pruliere-Escabasse *et al.* ^{38,183,184}. La rinosinusitis crónica afecta al 51,43% , porcentaje parecido al del estudio de Sommar *et al.* ¹⁸⁵. Y por último, 57,14% tienen neumonías de repetición, similar a los datos de Behan *et al.*, Íñiguez *et al.* y Jain *et al.* ^{38,183,186}.

En referencia a las pruebas diagnósticas realizadas y partiendo en todos los casos de una clínica comparable sobre la que se establecía la sospecha clínica de la enfermedad, se ha considerado como la más concluyente, la valoración de la función ciliar mediante el análisis de patrón y frecuencia del batido ciliar por vídeo-microscopía de alta velocidad³⁶. El estudio de batido ciliar se planteó siempre en periodos de estabilidad clínica, sin que el paciente hubiera sufrido ninguna reagudización, al menos un mes antes. En caso de duda, se repetía el estudio, las veces necesarias para corroborar los resultados.

En 22 de los pacientes incluidos en el estudio, se ha estudiado la ultraestructura ciliar mediante ME, encontrando defectos totales en los BID en el 31,82%, desorganización de MT en el 9,09%, transposición en el 4,55%, déficit parcial de dineína en el 13,64%, y 13,64% ha presentado una ultraestructura normal. El resto de pacientes no cuentan con un estudio ultraestructural

del cilio al no haber podido obtener cortes transversales suficientes y/o adecuados para su análisis, a pesar de la repetición de las biopsias. Estos datos reflejan que la ME sirve como prueba concluyente en el caso de encontrar un defecto compatible con la enfermedad, pero no permite descartar la DCP en el caso de que los cilios tengan una ultraestructura normal³⁶.

6.2. Relación del estrés oxidativo con la DCP

Los resultados de este estudio muestran una disminución estadísticamente significativa en los niveles de O_2^- total y mitocondrial, H_2O_2 mitocondrial, NO y $ONOO^-$, además de una disminución en el porcentaje de células apoptóticas en los sujetos con DCP respecto a controles. Se ha observado un aumento estadísticamente significativo en los pacientes respecto a los controles, en la masa mitocondrial medida por citometría de flujo, así como en el porcentaje de células vivas. Los resultados indican un pequeño incremento, estadísticamente no significativo, en el potencial de membrana mitocondrial. No se encuentran diferencias significativas entre controles y pacientes en los niveles intracelulares de Ca^{2+} , de GSH, o en el potencial de membrana plasmático.

Uno de los resultados más relevantes del trabajo es que en las células del epitelio nasal de los pacientes con DCP se han encontrado niveles de NO estadísticamente inferiores a los de los controles ($p=0,0076$). El NO es una molécula señalizadora intra- e intercelular implicada en diversos procesos fisiológicos y patofisiológicos¹⁸⁷. Tiene un papel muy importante en la defensa inmune; a nivel del sistema circulatorio es una molécula vasodilatadora; a nivel del sistema nervioso actúa como neurotransmisor; en biología reproductiva es responsable de la implantación del embrión en el útero y de la angiogénesis en el embrión; y por último, en referencia a la señalización, puede actuar como inhibidor o estimulador de la apoptosis según los casos¹⁸⁸.

El NO se sintetiza en las células a partir de la arginina, en un proceso que necesita el NADPH como cofactor, por el que se genera NADP⁺ y citrulina. Hay tres óxido nítrico sintasas principales responsables de la producción de NO: la NOS neuronal (nNOS o NOS1), la inducible (iNOS o NOS2) y la endotelial (eNOS o NOS3)^{189,190}. Las enzimas NOS1 y NOS3 producen NO en respuesta a los niveles de Ca²⁺. En cambio, la NOS2 es independiente de esos niveles, y se activa en la respuesta inmune, produciendo NO en los procesos de protección frente a las infecciones^{191,192,193,189}.

Diversos trabajos han demostrado que los niveles de nNO son muy bajos en los pacientes con DCP, tanto es así, que se utilizan como método de cribado para el diagnóstico de la enfermedad^{194,102}. Hay diversas hipótesis que tratan de explicar estos bajos niveles¹⁹¹. La primera de ellas postula que el NO producido por las células se consume rápidamente al interaccionar con ciertas ERO produciendo otras ERN¹⁹⁵⁻¹⁹⁸. Otra hipótesis explica los bajos niveles de nNO al quedar atrapado en el moco de los pacientes^{199,200}. También se podría entender por la presencia de bacterias denitrificantes, que reducirían los niveles de NO mediante la acción de una NO reductasa²⁰¹. Por otro lado, también se postula que el NO puede quedar atrapado en los senos paranasales obstruidos de los pacientes con DCP²⁰¹. Hay otras hipótesis que explican los bajos niveles de nNO por una reducción de la biosíntesis de NO. Esto puede deberse a la baja expresión de alguna NOS, concretamente la NOS2 que se activa frente a infecciones²⁰². También podría producirse por una baja disponibilidad de la L-arginina, sustrato de las NOS²⁰³⁻²⁰⁵. Y, por último, podría ser debida a la pérdida de actividad de las NOS por un desacoplamiento mecánico de la enzima. En este sentido, Narang *et al.* propusieron que la actividad de la NOS requiere de la función ciliar vía acoplamiento mecánico con las ATPasas de dineína que puede verse afectado en los pacientes con DCP²⁰⁶. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que los bajos niveles

de nNO en esta enfermedad se deben a una menor biosíntesis de la molécula, puesto que –a nivel celular- hemos visto que estos niveles son significativamente más bajos.

A su vez, los bajos niveles de NO encontrados en las células del epitelio nasal de los pacientes concuerda con el estudio de Li *et al*, que demuestra que en las células ciliadas, el NO regula la frecuencia de batido ciliar vía cAMP y cGMP. Así, el cAMP y cGMP activan a las protein-quinasas A y G, que fosforilan las cadenas ligeras de dineína aumentando el batido ciliar, que es deficiente en los pacientes con DCP²⁰⁷.

Otro resultado relevante del trabajo ha sido la detección, en las células de los pacientes con DCP, de unos niveles de ONOO⁻ y apoptosis estadísticamente inferiores a los de los controles ($p=0,0071$ y $p=0,0036$, respectivamente). Se ha demostrado que la combinación de O₂⁻ y NO *in vivo* da lugar a la formación de ONOO⁻¹⁸⁸. De ese modo, puesto que los niveles de NO y O₂⁻ son más bajos en los pacientes que en los controles, la producción de ONOO⁻ en estas células tiene que ser inferior. En la respuesta inmune, sobre todo, el NO producido por el iNOS estimula la apoptosis en presencia de O₂ mediante la vía de producción de peroxinitritos^{189,188}. En la DCP, dado que los niveles de NO, O₂⁻ en las células del epitelio nasal son más bajos, se produce menos

ONOO⁻ con lo que la estimulación de la apoptosis por esta vía es inferior a la de los controles sanos.

A nivel mitocondrial, se ha demostrado en este trabajo que a pesar de tener una mayor masa mitocondrial, los pacientes con DCP tienen niveles de H₂O₂ y O₂⁻ mitocondrial estadísticamente inferiores a los de los controles sanos (p<0,0001 y p=0,0004, respectivamente). Se habla de una NOS específica de la mitocondria que produce NO en este orgánulo. El NO en la mitocondria estimula la producción de H₂O₂ mitocondrial a través de la autooxidación del ubiquinol²⁰⁸. En condiciones normales, este H₂O₂ mitocondrial participa en cascadas de señalización. A su vez, el NO mitocondrial se combina con el O₂⁻ mitocondrial para producir ONOO⁻. En el caso específico de la mitocondria, se postula que la NOS mitocondrial puede funcionar como peroxinitrito sintasa, favoreciendo la producción de ONOO⁻ en este orgánulo²⁰⁸. En las células del epitelio nasal de los pacientes con DCP, aunque no se ha podido medir el NO específico de la mitocondria, sabemos que los valores de NO total son inferiores a los de los controles. Estos bajos niveles podrían explicar, en ellos, la menor producción de O₂⁻ y H₂O₂ mitocondrial, a pesar de su mayor masa mitocondrial respecto a los controles.

Por otro lado, no haber encontrado diferencias en el potencial de membrana plasmático y mitocondrial, ni en los parámetros de daño oxidativo sobre lípidos y proteínas, ni en los niveles de GSH y de Ca^{2+} intracelular demuestra que -al contrario de lo planteado en nuestra hipótesis inicial- los individuos con DCP no tienen más EO que los sujetos sanos. De hecho, los datos sobre el incremento de viabilidad celular en los sujetos enfermos respecto a los controles estarían en concordancia con esa menor afectación del EO en estos pacientes.

En referencia a la comparación del perfil oxidativo de los pacientes con DCP con distintos estados evolutivos, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros, entre los niños y adultos afectos. También se ha visto que las diferencias en la función ciliar tampoco influyen en los niveles de EO medidos en este estudio, al no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con distintos patrones de movilidad ciliar.

Respecto a la comparación entre sexos, se ha comprobado que las mujeres con DCP tienen niveles de O_2^- y H_2O_2 mitocondriales significativamente inferiores a los de los varones con la enfermedad ($p=0.0280$ y $p=0.0273$, respectivamente). Esto concuerda con estudios anteriores de Borrás *et al.* y Viña *et al.*

que demostraron en ratas, que la tasa de producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno es superior en machos que en hembras. Se demostró que en las hembras hay una mayor actividad de las enzimas antioxidantes Mn-SOD y GPx que en los machos, confiriéndoles una mayor protección frente al daño de los radicales libres responsables del envejecimiento, lo que reporta una evidencia molecular de la diferente esperanza de vida entre machos y hembras^{209,210}.

Por lo que respecta a la comparación entre los distintos parámetros de estudio en los pacientes con DCP en presencia, o no, de determinados síntomas, tampoco se han encontrado diferencias estadísticamente significativas. Así, no las hay entre los individuos con, o sin, otitis recurrentes. Tampoco entre pacientes con -o sin- asma, neumonías de repetición o bronquiectasias. En cambio, se ha visto que en los sujetos con atelectasias o *situs inversus*, los niveles de peróxidos intracelulares son significativamente superiores a los que no presentan estas anomalías ($p=0,0125$ y $p=0,0338$ respectivamente). Además, en los pacientes con rinosinusitis crónica los niveles de ONOO^- son significativamente inferiores a los que no la tienen ($p=0,0129$). En nuestro conocimiento no existe hasta la fecha ningún trabajo que justifique estos resultados, pues hay muy pocos estudios previos sobre la relación del EO con la DCP.

Por último, se ha encontrado un método diagnóstico que permite, mediante la combinación de los niveles de ONOO^- , O_2^- mitocondrial, carbonilación de proteínas, potencial de membrana plasmático y peróxidos intracelulares medidos en las biopsias del epitelio nasal, clasificar a nuevos individuos como “pacientes” o “controles”. Este árbol de decisión tiene una capacidad discriminativa del 80,5%, una sensibilidad diagnóstica del 71% y una especificidad del 82%. Aunque tendría que validarse prospectivamente con nuevos individuos, abre una puerta en el diagnóstico de esta enfermedad, que sigue siendo muy complejo, económicamente caro, y requiere personal muy especializado.

6.3. Limitaciones del estudio

Como en cualquier trabajo de investigación, hay que reconocer algunas limitaciones en nuestro estudio. Por una parte, en referencia al diagnóstico, no se han podido efectuar todas las pruebas diagnósticas en todos los pacientes: el análisis funcional de los cilios se realizó en los 35 casos, el análisis de la ultraestructura ciliar en 22 (en todos los que se pudieron encontrar cortes transversales suficientes para el estudio), y el nNO en 20, aquellos que pudieron colaborar. Se sabe que la DCP es una enfermedad compleja y que no existe una técnica *gold standard* para su diagnóstico. Por ello, para lograr diagnósticos

concluyentes, sería muy importante plantear un estudio genético de las mutaciones descritas hasta el momento. Sin embargo, en la actualidad se trata de una prueba aún no incluida como diagnóstico de rutina en la práctica clínica. Adicionalmente, el análisis de la expresión de las proteínas implicadas en la estructura ciliar mediante inmunofluorescencia, es una técnica que se está utilizando cada vez más y que permitiría estudiar algunos defectos ciliares partiendo de una cantidad de muestra mucho menor que la que se necesita para la ME. Del mismo modo, la puesta a punto de cultivos celulares de las muestras de los pacientes mediante la técnica interfaz aire-líquido, permitiría volver a analizar la función y ultraestructura ciliar, evitando que las infecciones pudieran interferir en el diagnóstico confundiendo las DCS con las primarias. La incorporación estos nuevos métodos es una de las apuestas de futuro de nuestro grupo, lo que permitirá diagnosticar a pacientes que -con los métodos actuales- no llegan a tener un diagnóstico concluyente.

Por otra parte, debido a que la DCP es una enfermedad rara, infradiagnosticada¹⁸, el número de sujetos incluidos en el estudio es relativamente pequeño. Por ello, con la “n” de este estudio, no se ha alcanzado el poder estadístico suficiente para afirmar diferencias en algunas de las comparaciones planteadas en el grupo de pacientes, entre distintas condiciones como -por

ejemplo- los diversos patrones de movilidad ciliar. Es necesario incrementar la formación/información sobre estas enfermedades entre los sanitarios que deberían sospecharlas (neonatólogos, pediatras de atención primaria, médicos generales, ORL, urólogos, etc.) y darles a conocer el circuito a seguir para derivar a los pacientes con esta sospecha clínica.

Por último, trabajar directamente "*in vivo*" con las células del epitelio nasal de los individuos con DCP, tiene la fortaleza de valorar el perfil oxidativo en el tejido propiamente afectado por la enfermedad. Pero, a su vez, esto ha sido otra limitación debido a la escasa cantidad de muestra, con la que se trabaja. En este caso, en el espécimen obtenido con las biopsias, se han podido medir muchos parámetros del perfil oxidativo mediante la citometría de flujo, al ser una técnica que no requiere grandes cantidades de material. Sin embargo, a la vista de los resultados obtenidos con ella, si se hubiera contado con una mayor cantidad de células, hubiese sido de gran interés estudiar la expresión de las enzimas antioxidantes y de las NOS mediante PCR cuantitativa a tiempo real, la actividad enzimática mediante ELISA y los niveles de proteína mediante *Western Blot*.

7. Conclusiones

1. En este estudio, los pacientes con DCP presentan niveles de apoptosis, NO, ONOO⁻, O₂⁻ total, H₂O₂ mitocondrial y O₂⁻ mitocondrial en sus células del epitelio nasal inferiores a los de los individuos sanos. Estos resultados son concordantes con los bajos niveles de nNO nasal característicos de los pacientes con DCP.
2. No se han encontrado diferencias en los valores de Ca²⁺ intracelular, potencial de membrana plasmático y potencial de membrana mitocondrial entre los grupos de pacientes y controles.
3. No se han detectado variaciones significativas en los niveles de carbonilación proteica y de peroxidación lipídica entre pacientes y controles, indicando que no hay diferencias en el grado de daño oxidativo sobre estas biomoléculas.
4. No hay diferencias entre niños y adultos en el perfil oxidativo de los pacientes con DCP.
5. No se han visto cambios significativos en los parámetros medidos entre pacientes con distintos patrones de movilidad ciliar.

6. La comparación entre sexos ha mostrado que las mujeres con DCP tienen niveles de H_2O_2 mitocondrial y O_2^- mitocondrial inferiores a los de los varones con la enfermedad, no encontrándose diferencias en el resto de parámetros medidos.
7. Al comparar los distintos parámetros de EO en los pacientes con DCP, en función de si presentaban o no determinados síntomas o alteraciones (asma, otitis, neumonías de repetición, bronquiectasias, atelectasias, rinosinusitis crónicas o *situs inversus*), se ha visto que en aquellos que tenían atelectasias o *situs inversus*, los niveles intracelulares de peróxidos eran en general superiores a los que no las tenían. Asimismo, los pacientes con rinosinusitis crónica tienen niveles más bajos de ONOO^- que los que no la presentan, no habiendo encontrado diferencias con los demás síntomas.
8. Se ha diseñado un árbol de decisión que permite clasificar a los individuos como “paciente” o “control sano”, en función de ciertos niveles de determinados parámetros de su perfil oxidativo. Este método debe validarse con nuevos individuos, pero es una

prometedora herramienta para ayudar al diagnóstico de la DCP.

8. Conclusions

1. In our study, patients with PCD have lower levels of apoptosis, NO, ONOO⁻, O₂⁻ total, mitochondrial H₂O₂ and mitochondrial O₂⁻ in their nasal epithelial cells than healthy individuals. These results are consistent with the characteristic low nNO levels of patients with PCD.
2. No differences were found in the values of intracellular Ca²⁺, plasma membrane potential and mitochondrial membrane potential between the groups of patients and controls.
3. No significant variations have been detected in protein carbonylation and lipid peroxidation levels between patients and controls, indicating that there are no differences in the oxidative damage degree on these biomolecules.
4. There are no differences between children and adults in the oxidative profile of patients with PCD.
5. No significant changes have been seen in the parameters measured between patients with different ciliary mobility patterns.

6. The comparison between sex have shown that women with PCD have mitochondrial H_2O_2 and mitochondrial O_2^- levels lower than those of men with the disease, with no differences in the rest of the parameters measured.

7. When comparing OS parameters among patients with PCD, depending on whether or not they had a certain symptom or alteration (asthma, otitis, recurrent pneumonias, bronchiectasis, atelectasis, chronic rhinosinusitis or *situs inversus*), we have seen that those who present atelectasis or *situs inversus*, have peroxides levels in general higher than patients who do not present these symptoms. Likewise, patients with chronic rhinosinusitis have lower levels of ONOO^- than those who do not have it, and there are no differences between patients according to the other symptoms.

8. A decision tree has been designed to classify individuals as patient or healthy control based on certain levels of the parameters of their oxidative profile. This method must be validated with new individuals, but it is a promising future tool to help with PCD diagnostics.

9. Bibliografía

1. Brown, J. M. & Witman, G. B. Cilia and diseases. *Bioscience* **64**, 1126–1137 (2014).
2. Fliegauf, M., Benzing, T. & Omran, H. When cilia go bad: Cilia defects and ciliopathies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 880–893 (2007).
3. Popatia, R., Haver, K. & Casey, A. Primary Ciliary Dyskinesia: An Update on New Diagnostic Modalities and Review of the Literature. *Pediatr. Allergy. Immunol. Pulmonol.* **27**, 51–59 (2014).
4. Siewart, A. Über einen Fall von Bronchiectasie bei einem Patienten mit situs inversus viscerum. *Berliner Klin. Wochenschrift* **41**, 139–141 (1904).
5. Kartagener Manes. Zur Pathogenese der Bronchiektasien. *Beitr. Klin. Tuberk. Spezif. Tuberkuloseforsch.* **31**, 277–290 (1933).
6. Afzelius B.A, Eliasson R., J. and L. C. Lack of Dynein Arms in Imotile Human Spermatozoa. *J. Cell Biol.* **66**, 225–232 (1975).
7. Afzelius, B. A. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* **193**, 317–319 (1976).
8. Eliasson, R., Mossberg, B., Camner, P. & Afzelius, B. A. The immotile-cilia syndrome. A congenital ciliary abnormality as an etiologic factor in chronic airway infections and male sterility. *N. Engl. J. Med.* **297**, 1–6 (1977).
9. Afzelius, B. A., Camner, P., Eliasson, R. & Mossberg, B. On renaming the immotile-cilia syndrome. *Lancet.* **2** (8251), 870 (1981).
10. Afzelius, B. A. & Mossberg, B. Immotile cilia. *Thorax* **35**, 401–404 (1980).
11. Rossman, C. M. & Newhouse, M. T. Primary ciliary dyskinesia: evaluation and management. *Pediatr. Pulmonol.* **5**, 36–50 (1988).
12. Veerman, A. J., Van der Baan, S. & Den Hollander, W.

- [Disorders in mucociliary transport. Primary ciliary dyskinesia]. *Tijdschr. Kindergeneeskd.* **51**, 185–192 (1983).
13. Fischer, L., Burri, P. H., Bauer, W., Kraemer, R. & Sauter, K. [How useful is the ultrastructural study of the cilia of the respiratory tract in the diagnosis of an immotile cilia syndrome?]. *Schweiz. Med. Wochenschr.* **114**, 610–619 (1984).
 14. Mygind, N., Pedersen, M. & Nielsen, M. H. Primary and secondary ciliary dyskinesia. *Acta Otolaryngol.* **95**, 688–694 (1983).
 15. Orphanet. Available at: <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>.
 16. FEDER. Available at: <http://www.enfermedades-raras.org/index.php/enfermedades-raras/enfermedades-raras-en-cifras>.
 17. Rovira, S. Discinesia ciliar primaria. *Tratado Neumol. Infant.* **11**, 991–1006 (2009).
 18. Kuehni, C. E. *et al.* Factors influencing age at diagnosis of primary ciliary dyskinesia in European children. *Eur. Respir. J.* **36**, 1248–1258 (2010).
 19. Behan, L. *et al.* Diagnosing primary ciliary dyskinesia: An international patient perspective. *Eur. Respir. J.* **48**, 1096–1107 (2016).
 20. Shapiro, A. J. *et al.* Diagnosis, monitoring, and treatment of primary ciliary dyskinesia: PCD foundation consensus recommendations based on state of the art review. *Pediatr. Pulmonol.* **51**, 115–132 (2016).
 21. Mullett, T. *et al.* Primary ciliary dyskinesia and neonatal respiratory distress. *Pediatrics* **134**, 1160–1166 (2014).
 22. Wessels, M. W., Den Hollander, N. S. & Willems, P. J. Mild fetal cerebral ventriculomegaly as a prenatal sonographic

- marker for Kartagener syndrome. *Prenat. Diagn.* **23**, 239–242 (2003).
23. Zihlif, N., Paraskakis, E., Lex, C., Van De Pohl, L. A. & Bush, A. Correlation between cough frequency and airway inflammation in children with primary ciliary dyskinesia. *Pediatr. Pulmonol.* **39**, 551–557 (2005).
 24. Davis, S. D. *et al.* Clinical features of childhood primary ciliary dyskinesia by genotype and ultrastructural phenotype. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **191**, 316–324 (2015).
 25. Marthin, J. K., Petersen, N., Skovgaard, L. T. & Nielsen, K. G. Lung function in patients with primary ciliary dyskinesia: A cross-sectional and 3-decade longitudinal study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **181**, 1262–1268 (2010).
 26. Noone, P. G. *et al.* Primary Ciliary Dyskinesia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**, 459–467 (2004).
 27. Armengot Carceller, M., Mata Roig, M., Milara Payá, X. & Cortijo Gimeno, J. Discinesia ciliar primaria. Ciliopatías. *Acta Otorrinolaringol. Esp.* **61**, 149–159 (2010).
 28. Majithia, A., Fong, J., Hariri, M. & Harcourt, J. Hearing outcomes in children with primary ciliary dyskinesia - A longitudinal study. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **69**, 1061–1064 (2005).
 29. Escudier, E., Duquesnoy, P., Papon, J. F. & Amselem, S. Ciliary defects and genetics of primary ciliary dyskinesia. *Paediatr. Respir. Rev.* **10**, 51–54 (2009).
 30. Shapiro, A. J. *et al.* Laterality defects other than situs inversus totalis in primary ciliary dyskinesia: Insights into situs ambiguus and heterotaxy. *Chest* **146**, 1176–1186 (2014).
 31. Kennedy, M. P. *et al.* Congenital heart disease and other heterotaxic defects in a large cohort of patients with

- primary ciliary dyskinesia. *Circulation* **115**, 2814–2821 (2007).
32. Halbert, S. A., Patton, D. L., Zarutskie, P. W. & Soules, M. R. Function and structure of cilia in the fallopian tube of an infertile woman with Kartagener's syndrome. *Hum. Reprod.* **12**, 55–58 (1997).
 33. Munro, N. C. *et al.* Fertility in men with primary ciliary dyskinesia presenting with respiratory infection. *Thorax* **49**, 684–687 (1994).
 34. Frija-Masson, J. *et al.* Clinical characteristics, functional respiratory decline and follow-up in adult patients with primary ciliary dyskinesia. *Thorax* **72**, 154–160 (2017).
 35. Sha, Y.-W., Ding, L. & Li, P. Management of primary ciliary dyskinesia/Kartagener's syndrome in infertile male patients and current progress in defining the underlying genetic mechanism. *Asian J. Androl.* **16**, 101-106 (2014).
 36. Lucas, J. S. *et al.* European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur. Respir. J.* **49** (1), (2017).
 37. Leigh, M. W. *et al.* Clinical Features and Associated Likelihood of Primary Ciliary Dyskinesia in Children and Adolescents. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **13**, 1305–1313 (2016).
 38. Behan, L. *et al.* PICADAR: A diagnostic predictive tool for primary ciliary dyskinesia. *Eur. Respir. J.* **47**, 1103–1112 (2016).
 39. Collins, S. A., Gove, K., Walker, W. & Lucas, J. S. A. Nasal nitric oxide screening for primary ciliary dyskinesia: systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. J.* **44**, 1589–1599 (2014).
 40. Jackson, C. L. *et al.* Accuracy of diagnostic testing in primary ciliary dyskinesia. *Eur. Respir. J.* **47**, 837–848 (2016).
 41. Hirst, R. A. *et al.* Culture of primary ciliary dyskinesia

- epithelial cells at air-liquid interface can alter ciliary phenotype but remains a robust and informative diagnostic aid. *PLoS One* **9** (2), (2014).
42. Shoemark, A., Dixon, M., Corrin, B. & Dewar, A. Twenty-year review of quantitative transmission electron microscopy for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *J. Clin. Pathol.* **65**, 267–271 (2012).
 43. Papon, J. F. *et al.* A 20-year experience of electron microscopy in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur. Respir. J.* **35**, 1057–1063 (2010).
 44. Lucas, J. S., Paff, T., Goggin, P. & Haarman, E. Diagnostic Methods in Primary Ciliary Dyskinesia. *Paediatr. Respir. Rev.* **18**, 8–17 (2016).
 45. Reula, A. *et al.* New insights in primary ciliary dyskinesia. *Expert Opin. Orphan Drugs* **5**, 537–548 (2017).
 46. Abitbul, R. *et al.* Primary ciliary dyskinesia in Israel: Prevalence, clinical features, current diagnosis and management practices. *Respir. Med.* **119**, 41–47 (2016).
 47. Hornef, N. *et al.* DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **174**, 120–126 (2006).
 48. Olbrich, H. *et al.* Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. *Nat. Genet.* **30**, 143–144 (2002).
 49. Omran, H. *et al.* Homozygosity mapping of a gene locus for primary ciliary dyskinesia on chromosome. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **23**, 696–702 (2000).
 50. Faily, M. *et al.* DNAI1 mutations explain only 2% of primary ciliary dyskinesia. *Respiration.* **76**, 198–204 (2008).
 51. Horváth, J. *et al.* Identification and analysis of axonemal dynein light chain 1 in primary ciliary dyskinesia patients. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **33**, 41–47 (2005).

52. Pennarun, G. *et al.* Loss-of-Function Mutations in a Human Gene Related to *Chlamydomonas reinhardtii* Dynein IC78 Result in Primary Ciliary Dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet* **65**, 1508–1519 (1999).
53. Zariwala, M. A. *et al.* Mutations of DNAI1 in primary ciliary dyskinesia: Evidence of founder effect in a common mutation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **174**, 858–866 (2006).
54. Zietkiewicz, E. *et al.* Population specificity of the DNAI1 gene mutation spectrum in primary ciliary dyskinesia (PCD). *Respir. Res.* **11**, 1–11 (2010).
55. Loges, N. T. *et al.* DNAI2 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Defects in the Outer Dynein Arm. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 547–558 (2008).
56. Mazor, M. *et al.* Primary ciliary dyskinesia caused by homozygous mutation in DNAL1, encoding dynein light chain 1. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 599–607 (2011).
57. Knowles, M. R. *et al.* Exome sequencing identifies mutations in CCDC114 as a cause of primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* **92**, 99–106 (2013).
58. Onoufriadis, A. *et al.* Splice-site mutations in the axonemal outer dynein arm docking complex gene CCDC114 cause primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* **92**, 88–98 (2013).
59. Wallmeier, J. *et al.* TTC25 Deficiency Results in Defects of the Outer Dynein Arm Docking Machinery and Primary Ciliary Dyskinesia with Left-Right Body Asymmetry Randomization. *Am. J. Hum. Genet.* **99**, 460–469 (2016).
60. Alsaadi, M. M. *et al.* Nonsense mutation in coiled-coil domain containing 151 gene (CCDC151) causes primary ciliary dyskinesia. *Hum. Mutat.* **35**, 1446–1448 (2014).
61. Hjeij, R. *et al.* CCDC151 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disruption of the outer dynein arm docking

- complex formation. *Am. J. Hum. Genet.* **95**, 257–274 (2014).
62. Hjeij, R. *et al.* ARMC4 mutations cause primary ciliary dyskinesia with randomization of left/right body asymmetry. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 357–367 (2013).
 63. Onoufriadis, A. *et al.* Combined exome and whole-genome sequencing identifies mutations in ARMC4 as a cause of primary ciliary dyskinesia with defects in the outer dynein arm. *J. Med. Genet.* **51**, 61–67 (2014).
 64. Panizzi, J. R. *et al.* NIH Public Access. **44**, 714–719 (2012).
 65. Duriez, B. *et al.* A common variant in combination with a nonsense mutation in a member of the thioredoxin family causes primary ciliary dyskinesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 3336–41 (2007).
 66. Duquesnoy, P. *et al.* Loss-of-Function Mutations in the Human Ortholog of *Chlamydomonas reinhardtii* ODA7 Disrupt Dynein Arm Assembly and Cause Primary Ciliary Dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* **85**, 890–896 (2009).
 67. Loges, N. T. *et al.* Deletions and Point Mutations of LRRC50 Cause Primary Ciliary Dyskinesia Due to Dynein Arm Defects. *Am. J. Hum. Genet.* **85**, 883–889 (2009).
 68. Omran, H. *et al.* Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature* **456**, 611–616 (2008).
 69. Mitchison, H. M. *et al.* Mutations in axonemal dynein assembly factor DNAAF3 cause primary ciliary dyskinesia. *Nat. Genet.* **44**, 1–24 (2012).
 70. Horani, A. *et al.* LRRC6 Mutation Causes Primary Ciliary Dyskinesia with Dynein Arm Defects. *PLoS One* **8**, 1–9 (2013).
 71. Kott, E. *et al.* Loss-of-function mutations in LRRC6, a gene essential for proper axonemal assembly of inner and outer dynein arms, cause primary ciliary dyskinesia. *Am. J.*

- Hum. Genet.* **91**, 958–964 (2012).
72. Horani, A. *et al.* Whole-exome capture and sequencing identifies HEATR2 mutation as a cause of primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* **91**, 685–693 (2012).
 73. Tarkar, A. *et al.* DYX1C1 is required for axonemal dynein assembly and ciliary motility. *Nat. Genet.* **45**, 995–1003 (2013).
 74. Austin-Tse, C. *et al.* Zebrafish ciliopathy screen plus human mutational analysis identifies C21orf59 and CCDC65 defects as causing primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 672–686 (2013).
 75. Moore, D. J. *et al.* Mutations in ZMYND10, a gene essential for proper axonemal assembly of inner and outer dynein arms in humans and flies, cause primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 346–356 (2013).
 76. Zariwala, M. A. *et al.* ZMYND10 is mutated in primary ciliary dyskinesia and interacts with LRRC6. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 336–345 (2013).
 77. Knowles, M. R. *et al.* Mutations in SPAG1 cause primary ciliary dyskinesia associated with defective outer and inner dynein arms. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 711–720 (2013).
 78. Imtiaz, F., Allam, R., Ramzan, K. & Al-Sayed, M. Variation in DNAH1 may contribute to primary ciliary dyskinesia. *BMC Med. Genet.* **16**, 1–6 (2015).
 79. Moore, A. *et al.* RPGR is mutated in patients with a complex X linked phenotype combining primary ciliary dyskinesia and retinitis pigmentosa. *J. Med. Genet.* **43**, 326–333 (2006).
 80. Bukowy-Bieryłło, Z. *et al.* RPGR mutations might cause reduced orientation of respiratory cilia. *Pediatr. Pulmonol.* **48**, 352–363 (2013).
 81. Budny, B. *et al.* A novel X-linked recessive mental

retardation syndrome comprising macrocephaly and ciliary dysfunction is allelic to oral-facial-digital type I syndrome. *Hum. Genet.* **120**, 171–178 (2006).

82. Paff, T. *et al.* Mutations in PIH1D3 Cause X-Linked Primary Ciliary Dyskinesia with Outer and Inner Dynein Arm Defects. *Am. J. Hum. Genet.* **100**, 160–168 (2017).
83. Pifferi, M. *et al.* New DNAH11 mutations in primary ciliary dyskinesia with normal axonemal ultrastructure. *The European respiratory journal* **35**, 1413–1416 (2010).
84. Knowles, M., Leigh, M., Carson, J. & Davis, S. Mutations of DNAH11 in Primary Ciliary Dyskinesia Patients with Normal Ciliary Ultrastructure. *Thorax* **67**, 433–441 (2012).
85. Olbrich, H. *et al.* Recessive HYDIN mutations cause primary ciliary dyskinesia without randomization of left-right body asymmetry. *Am. J. Hum. Genet.* **91**, 672–684 (2012).
86. Wirschell, M. *et al.* The nexin-dynein regulatory complex subunit DRC1 is essential for motile cilia function in algae and humans. *Nat. Genet.* **45**, 262–268 (2013).
87. Jeanson, L. *et al.* Mutations in GAS8, a Gene Encoding a Nexin-Dynein Regulatory Complex Subunit, Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Axonemal Disorganization. *Hum. Mutat.* **37**, 776–785 (2016).
88. Merveille, A. C. *et al.* CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs. *Nat. Genet.* **43**, 72–78 (2011).
89. Blanchon, S. *et al.* Delineation of CCDC39/CCDC40 mutation spectrum and associated phenotypes in primary: Ciliary dyskinesia. *J. Med. Genet.* **49**, 410–416 (2012).
90. Becker-Heck, A. *et al.* The coiled-coil domain containing protein CCDC40 is essential for morile cilia function and

- left-right axis formation. *Nat. Genet.* **43**, 79–84 (2011).
91. Castleman, V. H. *et al.* Mutations in radial spoke head protein genes RSPH9 and RSPH4A cause primary ciliary dyskinesia with central-microtubular-pair abnormalities. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 197–209 (2008).
 92. Kott, E. *et al.* Loss-of-function mutations in RSPH1 Cause primary ciliary dyskinesia with central-complex and radial-spoke defects. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 561–570 (2013).
 93. Zietkiewicz, E. *et al.* Mutations in radial spoke head genes and ultrastructural cilia defects in east-european cohort of primary ciliary dyskinesia patients. *PLoS One* **7**, 1–10 (2012).
 94. Knowles, M. R. *et al.* Mutations in RSPH1 cause primary ciliary dyskinesia with a unique clinical and ciliary phenotype. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 707–717 (2014).
 95. Onoufriadis, A. *et al.* Targeted NGS gene panel identifies mutations in RSPH1 causing primary ciliary dyskinesia and a common mechanism for ciliary central pair agenesis due to radial spoke defects. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 3362–3374 (2014).
 96. Jeanson, L. *et al.* RSPH3 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Central-Complex Defects and a Near Absence of Radial Spokes. *Am. J. Hum. Genet.* **97**, 153–162 (2015).
 97. El Khouri, E. *et al.* Mutations in DNAJB13, Encoding an HSP40 Family Member, Cause Primary Ciliary Dyskinesia and Male Infertility. *Am. J. Hum. Genet.* **99**, 489–500 (2016).
 98. Wallmeier, J. *et al.* Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat. Genet.* **46**, 646–651 (2014).
 99. Boon, M. *et al.* MCIDAS mutations result in a mucociliary

- clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat. Commun.* **5**, 4418 (2014).
100. Watson, C. M. *et al.* Robust Diagnostic Genetic Testing Using Solution Capture Enrichment and a Novel Variant-Filtering Interface. *Hum. Mutat.* **35**, 434–441 (2014).
 101. Mata, M. *et al.* New adenylate kinase 7 (AK7) mutation in primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Rhinol. Allergy* **26**, 260–264 (2012).
 102. Barbato, A. *et al.* Primary ciliary dyskinesia: A consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children. *Eur. Respir. J.* **34**, 1264–1276 (2009).
 103. Polineni, D., Davis, S. D. & Dell, S. D. Treatment recommendations in Primary Ciliary Dyskinesia. *Paediatr. Respir. Rev.* **18**, 39–45 (2016).
 104. Nuorti, J. P. & Whitney, C. G. Prevention of pneumococcal disease among infants and children - use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine - recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* **59**, 1–18 (2010).
 105. Chang, C. C., Morris, P. S. & Chang, A. B. Influenza vaccine for children and adults with bronchiectasis. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2007). doi:10.1002/14651858.CD006218.pub2
 106. Deuse, T. & Reitz, B. A. Heart-Lung Transplantation In Situs Inversus Totalis. *Ann. Thorac. Surg.* **88**, 1002–1003 (2009).
 107. Kennedy, M. P. *et al.* High-resolution CT of patients with primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Roentgenol.* **188**, 1232–1238 (2007).
 108. Lin, T. K. *et al.* A succesful Pregnancy with In Vitro Fertilization and Embryo Transfer in an Infertile Woman with Kartagener’s Syndrome: A Case Report. *J. Assist.*

Reprod. Genet. **15**, 625–627 (1998).

109. Romero MT, Rovira S, C. M. Manejo del paciente afecto de discinesia ciliar primaria. *AEPEP Protoc.* **1**, 423–438 (2017).
110. Shah, A. *et al.* A longitudinal study characterising a large adult primary ciliary dyskinesia population. *Eur. Respir. J.* **48**, 441–450 (2016).
111. Pifferi, M. *et al.* Health-related quality of life and unmet needs in patients with primary ciliary dyskinesia. *Eur. Respir. J.* **35**, 787–794 (2010).
112. Schröder, P. & Krutmann, J. Environmental Oxidative Stress – Environmental Sources of ROS. *React. Process.* **2**, 19–31 (2005).
113. Domej, W., Oettl, K. & Renner, W. Oxidative stress and free radicals in COPD- Implications and relevance for treatment. *Int J Chron Obs. Pulmon Dis* **9**, 1207–1224. (2014).
114. Weidinger, A. & Kozlov, A. V. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: Oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules* **5**, 472–484 (2015).
115. Le Bras, M., Clément, M.-V., Pervaiz, S. & Brenner, C. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol. Histopathol.* **20**, 205–219 (2005).
116. Figueira, T. R. *et al.* Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 2029–2074 (2013).
117. Alfadda, A. A. & Sallam, R. M. Reactive oxygen species in health and disease. *J. Biomed. Biotechnol.* (2012). doi:10.1155/2012/936486
118. Elejalde Guerra, J. I. [Oxidative stress, diseases and

- antioxidant treatment]. *An. Med. Interna* **18**, 326–335 (2001).
119. Chance, B., Schoener, B., Oshino, R., Itshak, F. & Nakase, Y. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J. Biol. Chem.* **254**, 4764–4771 (1979).
 120. Sies, H., Berndt, C. & Jones, D. P. Oxidative stress. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 715–748 (2017).
 121. Finkel, T. & Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239–247 (2000).
 122. Pamplona, R. & Costantini, D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **301**, R843–R863 (2011).
 123. Rahman, T., Hosen, I., Islam, M. M. T. & Shekhar, H. U. Oxidative stress and human health. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **03**, 997–1019 (2012).
 124. Gupta, R. K. *et al.* Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **15**, 4405–9 (2014).
 125. Levine, M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *N. Engl. J. Med.* **314**, 892–902 (1986).
 126. Céspedes, T. & Sánchez, D. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Rev. Cuba. Cardiol. Y Cirugía Cardiovasc.* **14**, 55 (2000).
 127. Harris, E. D. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **6**, 2675–2683 (1992).
 128. Lippman, R. D. Rapid in vivo quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man. *Exp. Gerontol.* **20**, 1–5 (1985).
 129. Díaz-Costa, A. Consecuencias fisiológicas de la oxidación

- de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Rev.Esp.Cienc.Quim.Biol* **9**, 34–44 (2006).
130. Stadtman, E. R., Starke-Reed, P. E., Oliver, C. N., Carney, J. M. & Floyd, R. A. Protein modification in aging. *EXS* **62**, 64–72 (1992).
 131. Ames, B. N., Shigenaga, M. K. & Hagen, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 7915–7922 (1993).
 132. Behera, R., Goel, S. & Das, S. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease : Targeting with Nanotechnology. *Biochem. Biophysical J. Neutron Ther. Cancer Treat.* **2**, (2014).
 133. Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R. & Yan, G. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques* **23**, 525–531 (1997).
 134. Peterson, J. D., Herzenberg, L. A., Vasquez, K. & Waltenbaugh, C. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 3071–3076 (1998).
 135. Kim, H. J., Barajas, B., Chan, R. C. F. & Nel, A. E. Glutathione depletion inhibits dendritic cell maturation and delayed-type hypersensitivity: Implications for systemic disease and immunosenescence. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 1225–1233 (2007).
 136. Murata, Y., Shimamura, T. & Hamuro, J. The polarization of T(h)1/T(h)2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. *Int. Immunol.* **14**, 201–212 (2002).
 137. Cantin, A. M., North, S. L., Fells, G. A., Hubbard, R. C. & Crystal, R. G. Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* **79**, 1665–1673 (1987).
 138. Montuschi, P. *et al.* 8-Isoprostane as a biomarker of

- oxidative stress in interstitial lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**, 1524–1527 (1998).
139. Szabo, E., Riffe, M. E., Steinberg, S. M., Birrer, M. J. & Linnoila, R. I. Altered cJUN expression: an early event in human lung carcinogenesis. *Cancer Res.* **56**, 305–15 (1996).
 140. Volm, M., van Kaick, G. & Mattern, J. Analysis of c-fos, c-jun, c-erbB1, c-erbB2 and c-myc in primary lung carcinomas and their lymph node metastases. *Clin. Exp. Metastasis* **12**, 329–334 (1994).
 141. Stewart, Z. A. & Pietenpol, J. A. p53 Signaling and cell cycle checkpoints. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 243–263 (2001).
 142. Escribano, A. *et al.* Decreased glutathione and low catalase activity contribute to oxidative stress in children with α -1 antitrypsin deficiency. *Thorax* **70**, 82–83 (2015).
 143. Biswas, S. K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 5698931 (2016).
 144. Lee, Y.-M., Song, B. C. & Yeum, K.-J. Impact of Volatile Anesthetics on Oxidative Stress and Inflammation. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–8 (2015).
 145. Zihlif, N., Paraskakis, E., Tripoli, C., Lex, C. & Bush, A. Markers of airway inflammation in primary ciliary dyskinesia studied using exhaled breath condensate. *Pediatr. Pulmonol.* **41**, 509–514 (2006).
 146. World Medical Association. Declaration of Helsinki. *Br. Med. J.* **313**, 1448–1449. (1996).
 147. Wood, J. C. & Hoffman, R. A. Evaluating fluorescence sensitivity on flow cytometers: an overview. *Cytometry* **33**, 256–259 (1998).
 148. Evans, J. A., Darlington, D. N. & Gann, D. S. A circulating factor(s) mediates cell depolarization in hemorrhagic shock. *Ann. Surg.* **213**, 549–56 (1991).

149. Gee, K. R. *et al.* Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes. *Cell Calcium* **27**, 97–106 (2000).
150. Hedley, D. W. & Chow, S. Evaluation of Methods for Measuring Cellular Gluthione Content Using Flow Cytometry. *Cytometry* **15**, 349–358 (1994).
151. Díez, I. *et al.* Nitric oxide, derived from inducible nitric oxide synthase, decreases hypoxia inducible factor-1 α in macrophages during aspirin-induced mesenteric inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **159**, 1636–1645 (2010).
152. Eruslanov, E. & Kusmartsev, S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol. Biol.* **594**, 57–72 (2010).
153. Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Yoshihiro, K., Haskó, G. & Pacher, P. Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 203–208 (2007).
154. Presley, A. D., Fuller, K. M. & Arriaga, E. a. MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* **793**, 141–150 (2003).
155. Naguib, Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1150–1154 (2000).
156. Petrat, F., Pindiur, S., Kirsch, M. & De Groot, H. ‘Mitochondrial’ photochemical drugs do not release toxic amounts of $1O_2$ within the mitochondrial matrix space. *Arch. Biochem. Biophys.* **412**, 207–215 (2003).
157. Crow, J. P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: Implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **1**, 145–157 (1997).

158. Kalyanaraman, B. Oxidative chemistry of fluorescent dyes: implications in the detection of reactive oxygen and nitrogen species. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1221–1225 (2011).
159. Iwai, I., Shimadzu, K., Kobayashi, Y., Hirao, T. & Etou, T. Increased carbonyl protein level in the stratum corneum of inflammatory skin disorders: A non-invasive approach. *J. Dermatol.* **37**, 693–698 (2010).
160. Chaudhuri, A. R. *et al.* Detection of protein carbonyls in aging liver tissue: A fluorescence-based proteomic approach. *Mech. Ageing Dev.* **127**, 849–861 (2006).
161. Dickinson, B. C., Lin, V. S. & Chang, C. J. Preparation and use of MitoPY1 for imaging hydrogen peroxide in mitochondria of live cells. *Nat. Protoc.* **8**, 1249–1259 (2013).
162. Wallberg, F., Tenev, T. & Meier, P. Analysis of Apoptosis and Necroptosis by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, pdb.prot087387 (2016).
163. Perumalsamy, H. *et al.* Cellular effect of styrene substituted biscoumarin caused cellular apoptosis and cell cycle arrest in human breast cancer cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **92**, 104–114 (2017).
164. Gimenez-Garzo, C. *et al.* Cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy have increased capacity to eliminate superoxide and peroxynitrite in lymphocytes, associated with cognitive impairment. *Free Radic. Res.* **52**, 118–133 (2018).
165. Herrera, G., Martinez, A., O’Cornor, J.-E. & Blanco, M. Functional assays of oxidative stress using genetically engineered *Escherichia coli* strains. *Curr. Protoc. Cytom.* **Chapter 11**, Unit 11.16 (2003).
166. Khailova, L. S., Rokitskaya, T. I., Kotova, E. A. & Antonenko, Y. N. Effect of cyanide on mitochondrial membrane depolarization induced by uncouplers. *Biochem.* **82**,

- 1140–1146 (2017).
167. Akasaki, Y. *et al.* FoxO Transcription Factors Support Oxidative Stress Resistance in Human Chondrocytes. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 3349–3358 (2014).
 168. Thor, H. *et al.* The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells. *J. Biol. Chem.* **257**, 12419–12425 (1982).
 169. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (2018)
 170. Peña, D. Análisis de datos multivariantes. *McGraw-Hill España*. (2013).
 171. Manzano, J. A. El análisis discriminante. Available at: <https://wwwyyy.files.wordpress.com/2013/03/anc3a1lisis-discriminante.pdf>. (2013)
 172. Breiman, L. Classification and regression trees. *Routledge*. (2017).
 173. Kamiński, B., Jakubczyk, M., & Szufel, P. A framework for sensitivity analysis of decision trees. *Cent. Eur. J. Oper. Res.* **26**, 1–25 (2018).
 174. Robin, X. *et al.* pROC: An open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics* **12**, 1-8 (2011).
 175. Manna, P. & Jain, S. K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **13**, 423–444 (2015).
 176. Organización Mundial de la Salud. Available at: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
 177. Romero MT, Carda C, Milara J, Armengot M, E. A. Clinical, morphological and functional features of primary ciliary

- dyskinesia children in southeast Spain. *Paediatr Respir Rev.* **14**, S52 (2013)
178. Hosie, P. *et al.* Presentation of primary ciliary dyskinesia in children: 30 years' experience. *J. Paediatr. Child Health* **51**, 722-726 (2017).
 179. Lesic, I. *et al.* [Primary ciliary dyskinesia (Pcd) in Austria]. *Wien. Klin. Wochenschr.* **121**, 616–622 (2009).
 180. Beucher, J., Chambellan, A., Segalen, J. & Deneuille, E. [Primary ciliary dyskinesia: a retrospective review of clinical and paraclinical data]. *Rev. Mal. Respir.* **28**, 856–863 (2011).
 181. Dettmer, S. *et al.* Computed tomography in adult patients with primary ciliary dyskinesia: Typical imaging findings. *PLoS One* **13**, e0191457 (2018).
 182. Busquets, R. M., Caballero-Rabasco, M. A., Velasco, M., Lloreta, J. & Garcia-Algar, O. Primary ciliary dyskinesia: clinical criteria indicating ultrastructural studies. *Arch. Bronconeumol.* **49**, 99–104 (2013).
 183. Iñiguez C, R., Fonseca A, X., Hernández C, J., González B, S. & Sánchez D, I. Disquinesia ciliar: Diagnóstico ultraestructural, evolución clínica y alternativas de tratamiento. *Rev. Med. Chil.* **135**, 1147–1152 (2007).
 184. Oktem, S. *et al.* Sleep disordered breathing in patients with primary ciliary dyskinesia. *Pediatr. Pulmonol.* **48**, 897–903 (2013).
 185. Sommer, J. U. *et al.* ENT manifestations in patients with primary ciliary dyskinesia: prevalence and significance of otorhinolaryngologic co-morbidities. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **268**, 383–388 (2011).
 186. Jain, K. *et al.* Primary ciliary dyskinesia in the paediatric population: range and severity of radiological findings in a cohort of patients receiving tertiary care. *Clin. Radiol.* **62**, 986–993 (2007).

187. Paraskakis, E., Zihlif, N. & Bush, A. Nitric oxide production in PCD: possible evidence for differential nitric oxide synthase function. *Pediatr. Pulmonol.* **42**, 876–880 (2007).
188. Moncada, S. & Bolaños, J. Óxido nítrico y respiración celular: Fisiología y Fisiopatología. *Haematol. (ed. esp.)* **287**, 95-97 (2003).
189. Brüne, B., von Knethen, A. & Sandau, K. B. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur.J.Pharmacol.* **351**, 261–272 (1998).
190. Degano, B., Valmary, S., Serrano, E., Brousset, P. & Arnal, J. F. Expression of nitric oxide synthases in primary ciliary dyskinesia. *Hum. Pathol.* **42**, 1855–1861 (2011).
191. Walker, W. T., Jackson, C. L., Lackie, P. M., Hogg, C. & Lucas, J. S. Nitric oxide in primary ciliary dyskinesia. *Eur. Respir. J.* **40**, 1024–1032 (2012).
192. Jackson, C. L. *et al.* Neuronal NOS localises to human airway cilia. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **44**, 3–7 (2015).
193. Smith, C. M. *et al.* Ciliated cultures from patients with primary ciliary dyskinesia do not produce nitric oxide or inducible nitric oxide synthase during early infection. *Chest* **144**, 1671–1676 (2013).
194. Bush, A. *et al.* Primary ciliary dyskinesia: Current state of the art. *Arch. Dis. Child.* **92**, 1136–1140 (2007).
195. Jones, K. L. *et al.* Superoxide released from neutrophils causes a reduction in nitric oxide gas. *Am. J. Physiol.* **275**, L1120-6 (1998).
196. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. & Freeman, B. A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 481–487 (1991).
197. Thomas, D. D. *et al.* The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 18–31 (2008).

198. Gaston, B., Singel, D., Doctor, A. & Stamler, J. S. S-nitrosothiol signaling in respiratory biology. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**, 1186–1193 (2006).
199. Grasemann, H. *et al.* Nitric oxide metabolites in cystic fibrosis lung disease. *Arch. Dis. Child.* **78**, 49–53 (1998).
200. Franklin, P. J. *et al.* Exhaled nitric oxide is not reduced in infants with cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* **27**, 350–353 (2006).
201. Kelley, T. J. & Drumm, M. L. Inducible nitric oxide synthase expression is reduced in cystic fibrosis murine and human airway epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **102**, 1200–1207 (1998).
202. Pifferi, M. *et al.* Nasal nitric oxide and nitric oxide synthase expression in primary ciliary dyskinesia. *Eur. Respir. J.* **37**, 572–7 (2011).
203. Grasemann, H., Schwiertz, R., Matthiesen, S., Racke, K. & Ratjen, F. Increased arginase activity in cystic fibrosis airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 1523–1528 (2005).
204. Grasemann, H. *et al.* Effect of L-arginine infusion on airway NO in cystic fibrosis and primary ciliary dyskinesia syndrome. *Eur. Respir. J.* **13**, 114–118 (1999).
205. Loukides, S., Kharitonov, S., Wodehouse, T., Cole, P. J. & Barnes, P. J. Effect of arginine on mucociliary function in primary ciliary dyskinesia. *Lancet* **352**, 371–372 (1998).
206. Narang, I., Ersu, R., Wilson, N. M. & Bush, A. Nitric oxide in chronic airway inflammation in children: diagnostic use and pathophysiological significance. *Thorax* **57**, 586–589 (2002).
207. Li, D., Shirakami, G., Zhan, X. & Johns, R. A. Regulation of ciliary beat frequency by the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling pathway in rat airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **23**, 175–181 (2000).

208. Saavedra, A. *et al.* Papel patofisiológico del Óxido Nítrico Mitocondrial. *Mensaje Bioquímico Vol XXVIII*. **28**, 27–43 (2004).
209. Borrás, C. *et al.* Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 546–552 (2003).
210. Vina, J., Sastre, J., Pallardo, F. & Borras, C. Mitochondrial theory of aging: importance to explain why females live longer than males. *Antioxid. Redox Signal.* **5**, 549–556 (2003).

10. Trabajos derivados

10.1. Comunicaciones científicas

- ⇒ DASI F, REULA A, PASTOR S, CASTILLO S, BAÑULS L, VICENTE-FERRER S, NAVARRO-GARCÍA M, ARMENGOT M, ESCRIBANO A. Increased Oxidative Stress in Nasal Epithelial Cells of Primary Ciliary Dyskinesia Patients. 2017 ATS International Conferencie. Washington, Estados Unidos. Mayo, 2017.
- ⇒ REULA A. Caracterización del perfil oxidativo en células epiteliales nasales de pacientes con Discinesia Ciliar Primaria. XXXIX Reunión de la Sociedad Española de Neumología Pediátrica. Córdoba, España. 4-6 mayo, 2017.
- ⇒ REULA A. Oxidative stress in rare respiratory diseases: PCD. 2nd BEAT-PCD Conference and 3rd BEAT-PCD Training School. Valencia, España. 18-21 Abril, 2017.
- ⇒ REULA A. Experiencia en el manejo multidisciplinar de investigación en Discinesia Ciliar Primaria: Modelo Southampton. Jornada Investigación en Enfermedades Raras: ciliopatías. Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. Valencia, España. 27 febrero, 2017.

- ⇒ REULA A, PASTOR S, CASTILLO S, VICENTE-FERRER S, GARCÍA I, ESCRIBANO A, ARMENGOT M, DASÍ F. Increased oxidative stress in ciliated nasal epithelial cells from patients with Primary Ciliary Dyskinesia. ERS Congress. Londres, Reino Unido. 3-7 Septiembre, 2016.
- ⇒ REULA A, ESCRIBANO A, CAMACHO S, CASTILLO S, PASTOR S, GARCÍA I, VICENTE-FERRER S, ARMENGOT M, DASÍ F. Aumento de los niveles de estrés oxidativo en células epiteliales nasales de pacientes con Discinesia Ciliar Primaria. 49 Congreso SEPAR. Granada, España. 10-13 junio, 2016.
- ⇒ REULA A, VICENTE-FERRER S, PASTOR S, ARMENGOT M, ESCRIBANO A, DASÍ F. Role of oxidative stress in the pathophysiology of Primary Ciliary Dyskinesia. COST BEAT-PCD Training School/ 2nd Young Researchers' Meeting. Paris, Francia. 27-29 Abril, 2016.
- ⇒ REULA A, PASTOR S, VICENTE-FERRER S, ARMENGOT M, ESCRIBANO A, DASÍ F. Oxidative stress in nasal epithelial cells from patients with Primary Ciliary Dyskinesia. 14th ERS Lung Science Conference. Estoril, Portugal. 10-13 Marzo, 2016.

- ⇒ REULA A, PASTOR S, VICENTE-FERRER S, GARCÍA I, CASTILLO S, ARMENGOT M, ESCRIBANO A, DASÍ F. Estrés oxidativo en células del epitelio nasal ciliado de pacientes con Discinesia Ciliar Primaria. I Congreso Internacional de Enfermedades Raras Respiratorias. INCLIVA. Valencia, España. 17-18 febrero, 2016.
- ⇒ REULA A. Resultados de Investigación en Síndrome de Discinesia Ciliar Primaria. Jornada de Investigación en Síndrome de Discinesia Ciliar Primaria. Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA. Valencia, España. 10 diciembre, 2015.
- ⇒ CAMACHO S, REULA A, PASTOR S, ESCRIBANO A, ARMENGOT M. Estrés oxidativo en células epiteliales nasales de pacientes con Síndrome de Discinesia Ciliar Primaria. VIII Congreso Nacional de Enfermedades Raras. FEDER. Murcia, España. 15-17 octubre, 2015.

10.2. Proyectos de investigación financiados

- ⇒ AYUDA A LA INVESTIGACIÓN DE LA SOCIEDAD VALENCIANA DE NEUMOLOGÍA/ FUNDACIÓN DE

NEUMOLOGÍA DE LA COMUNIDAD VALENCIANA (FNCV).
Título: “Caracterización del estrés oxidativo en células epiteliales nasales de pacientes con Discinesia Ciliar Primaria”. Investigadora Principal: Dra. Amparo Escribano Montaner. 2015-2018

⇒ AYUDA A LA INVESTIGACIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NEUMOLOGÍA PEDIÁTRICA (SENP). Título: “Caracterización del perfil oxidativo en células epiteliales nasales de pacientes con Discinesia Ciliar Primaria”. Investigadora Principal: Dra. Amparo Escribano Montaner. 2015-2017

10.3. Premios recibidos

⇒ Premio I CONGRESO INTERNACIONAL DE ENFERMEDADES RARAS RESPIRATORIAS a la comunicación: “Estrés oxidativo en células del epitelio nasal ciliado de pacientes con Discinesia Ciliar Primaria”. Autor de presentación: Ana Reula. Fecha: Febrero 2016.

11. Anexos

11.1. Anexo 1



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 |

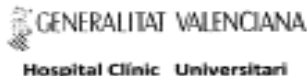
Acuerda respecto a esta documentación:

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 | |
|--|--|-----------------------------|---------|----------|--|
| Presidentes | Dr. Severiano Marin Bertolin | x | | | |
| | D. Ernesto Bataller Alonso | | | x | |
| | D. Alejandro Moner González | | | x | |
| Miembros Legos | Dña. M ^a Teresa Jareño Roglan | | x | | |
| | Dña. Encarna Domingo Cebrián | x | | | |
| | D. Jaime Alapont Pérez | x | | | |
| | Dña. Carmen Samiento Cabañas | x | | | |
| | D. Antonio Baltasar Olivas Nevado | | x | | |
| | Dr. D. José Manuel Iranzo Miguélez | | x | | |
| | Dr. D. Miguel Armengot Carceller | x | | | |
| | Dr. D. Julio Cortijo Gimeno | x | | | |
| | Vocales | Dra. Dña. Elena Rubio Gomis | x | | |
| | | Dr. D. Gustavo Juan Samper | x | | |
| Dra. Pilar Blasco Segura | | x | | | |
| Dra. M ^a José Safont Aguilera | | | x | | |
| | Dra. Ana Blasco Cordellat | x | | | |

11.2. Anexo 2



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. : 
Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica

11.3. Anexo 3

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Se le ofrece 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 1/10.000-60.000 individuos, por lo que se considera como una enfermedad rara o de baja prevalencia. Su causa es una falta total de cilios (aplasia ciliar), o una anomalía de la función ciliar que, o bien impide que los cilios del organismo puedan moverse (síndrome del cilio inmóvil), o que lo hagan de forma adecuada (discinesia ciliar). En ambos casos, los cilios no cumplen su función de transporte o/y 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. El trastorno de la movilidad ciliar afecta también al espermatozoide y a los cilios que tapizan el aparato genital femenino, por lo que es común la esterilidad en los varones y una fertilidad reducida en las mujeres. Además, el papel de los cilios en la distribución embrionaria de los órganos internos da lugar a que un 50% de estos pacientes, presenten un *situs inversus*.

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 las células del epitelio respiratorio, lo que se conoce como "estrés oxidativo".

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 biopsias del epitelio nasal determinando, en ellas, el perfil oxidativo de las células. 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 ciladas 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 le 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 grupos de pacientes diagnosticados de DCP y de voluntarios sanos.

Dado que usted, o su hijo/a, pertenecen a uno de estos grupos, se le pide su 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 su epitelio respiratorio ciliado nasal obtenido por medio de un cepillado superficial en el cornete medio nasal, que proporciona una muestra biopsica.

La participación en el presente proyecto no supone ninguna alteración del tratamiento que este 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 usted, o su hijo/a, pertenecen al grupo de pacientes, ya han sido sometidos a la prueba diagnóstica de DCP que, como saben, consiste en un cepillado nasal para obtener una muestra de células ciliadas, por lo que conocen que la técnica es sencilla, rápida y prácticamente exenta de ningún riesgo. Tan sólo notarán una pequeña molestia en el punto del rascado que, sólo ocasionalmente, puede acompañarse de un leve sangrado local que, en caso que se produzca, cede rápida y espontáneamente. De cualquier forma, el procedimiento lo realizará un otorrinolaringólogo.

Si usted, o su hijo/a pertenecen al grupo control, la toma de muestra nasal la efectúa alguno de los clínicos que forman parte del grupo Investigador, expertos en esta técnica, introducir un cepillo que rascará superficialmente la cavidad el comete medio nasal. Además, es posible que, si usted pertenece al grupo control, 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. El riesgo es una leve hemorragia que controlaría el otorrinolaringólogo en el improbable caso de no ceder espontáneamente.

Estas 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 usted, 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?

Su 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 su 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 del proyecto, el Dr. XXX en el teléfono XXX, extensión XXX

Confidencialidad:

Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con su 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 cilado nasal. Esta muestra será siempre utilizada con fines científicos, pudiéndose utilizar, si usted así lo autoriza, 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 Disquinesia Ciliar Primaria

Investigadora principal: XXX

Servicio: XXX

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 XXX.

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

11.4. Anexo 4

Tabla suplementaria 1. Tabla de recogida de datos clínicos de los sujetos participantes en el estudio.

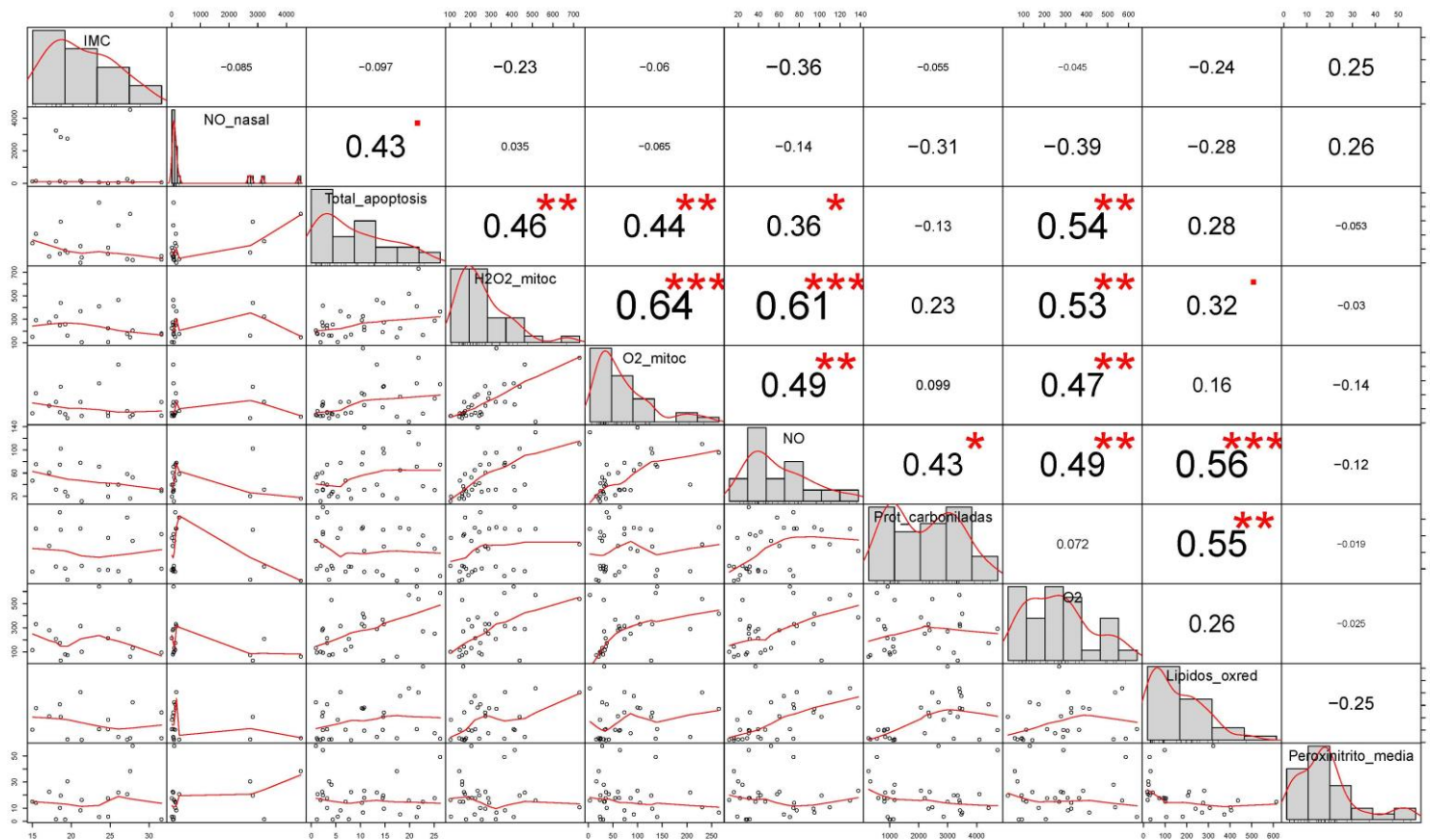
| | | |
|---|----|----|
| Nombre Paciente | | |
| Fecha de nacimiento | | |
| Edad actual (años) | | |
| Sexo | M | F |
| Peso (Kg) | | |
| Talla (cm) | | |
| IMC (Kg/m²) | | |
| Edad comienzo clínica (años) | | |
| Problemas fertilidad | SI | NO |
| Fumador | SI | NO |
| Antecedentes DCP | SI | NO |
| Antecedentes rinosinusitis crónica | SI | NO |
| Tos productiva crónica | SI | NO |
| Neumonías | SI | NO |
| Bronquiectasias | SI | NO |
| Atelectasias | SI | NO |
| Asma | SI | NO |
| Otitis | SI | NO |
| Rinosinusitis | SI | NO |
| <i>Situs inversus</i> | SI | NO |

11.5. Anexo 5

Tabla suplementaria 2. Tabla de clasificación de las alteraciones clínicas encontradas en los pacientes en análisis de la ultra estructura y función ciliar, y medida del nNO.

| PRUEBA | FECHA | RESULTADO |
|---------------------------|-------|---------------------------------------|
| ULTRAESTRUCTURA CILIAR | | Déficit completo BED y BID |
| | | Déficit completo BED |
| | | Déficit completo BID |
| | | Falta par central de microtúbulos |
| | | Desorganización de microtúbulos |
| | | Transposición |
| | | Déficit parcial de dineína |
| | | Normal |
| MOVILIDAD CILIAR | | Cilios inmóviles |
| | | Movilidad vibrátil |
| | | Amplitud reducida e incoordinación |
| | | Patrón normal, frecuencia reducida |
| ÓXIDO NÍTRICO NASAL | | Media aritmética de 3 medidas, en ppb |

Anexo 6



Francisco Dasí y Amparo Escribano
Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA/ Servicio de Pediatría

Valencia, 4 de octubre de 2018

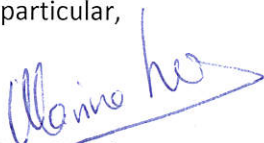
Estimados Dr. Dasí y Dra. Escribano

El motivo de la presente es informarle que en la pasada reunión del Comité de fecha 27 de septiembre de 2018, se evaluó su notificación de la realización de la Tesis Doctoral de Doña Ana Reula Martín "Estudio del estrés oxidativo en el epitelio nasal ciliado de pacientes con Discinesia Ciliar Primaria".

Dado que se ha realizado en el marco proyecto "Caracterización del estrés oxidativo en células epiteliales nasales de pacientes con Discinesia Ciliar Primaria" financiado por la Sociedad Española de Neumología Pediátrica y aprobado con fecha 29 de enero de 2015 y la doctoranda, de Doña Ana Reula Martín, forma parte del Equipo investigador, se acordó informar favorablemente al desarrollo de la citada Tesis Doctoral.

En caso de requerir información adicional, no duden en ponerse en contacto con la Secretaría del Comité.

Sin otro particular,



Marina Soro Domingo
Presidenta del Comité Ético de Investigación clínica
Hospital Clínic Universitario de Valencia

