



VNIVERSITATĪ VALÈNCIA

Efecto de la hipoxia en la degranulación,
producción de citoquinas y perfil oxidativo
de neutrófilos en pacientes con déficit de
alfa-1 antitripsina

MARÍA MAGALLÓN SERRANO

TESIS DOCTORAL

Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Fisiología
Programa de Doctorado en Fisiología (3127)

Director:

Dr. Francisco Dasí Fernández

SEPTIEMBRE 2022

Dr. Francisco Dasí Fernández, Profesor Titular del
Dpto. de Fisiología de la Universitat de València,

CERTIFICA/N:

Que la presente memoria, titulada “Efecto de la hipoxia en la degranulación, producción de citoquinas y perfil oxidativo de neutrófilos en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. María Magallón Serrano, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firma/n el presente certificado en
Valencia, a 6 de septiembre de 2022.

Firmado por DASÍ FERNANDEZ, FRANCISCO
JOSE (FIRMA) con DNI 24335948Q el día
06/09/2022 con un certificado emitido por AC DNIE
004

Fdo. Dr. Francisco Dasí

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiera sido posible sin la colaboración y el apoyo de varias personas a las que quiero mostrar mi más sincero agradecimiento:

En primer lugar, al Dr. Francisco Dasí por su labor como tutor, no solo por todo lo aprendido en estos años y sus buenos consejos sino también por transmitirme su ilusión por la investigación en el campo de las enfermedades raras, tan necesaria. Gracias por la confianza que has depositado en mí, sin ella la realización de este trabajo no hubiera sido posible.

A Silvia, Cruz y Alberto por ser nuestro nexo con los pacientes y hacernos ver la importancia del trabajo en equipo entre clínicos e investigadores para poder avanzar en el conocimiento del déficit.

A los alfas y sus familiares que siempre han estado dispuestos a colaborar con nosotros e incluso han animado a amigos y conocidos a sacarse sangre para nosotros, siempre con una sonrisa y poniendo en valor nuestro trabajo más que nosotros mismos.

A mis compañeros del labo35 y todas las personas que han pasado por él dejando su huella. A Dani por alegrarme tardes eternas en el citómetro con los temazos de Shakira. A Juanjo que, a pesar de aparecer con suspenso en geografía, se ha convertido en un gran apoyo. Y en especial a mi Luci que tras estos años me ha demostrado que no había mejor persona y amiga con la que recorrer este camino,

siempre con su sonrisa o la palabra que necesitaba escuchar en cada momento. Gracias chicos, sin vosotros no hubiera podido.

A mis amigos, en especial a las de toda la vida, a esas que, aunque no veas todos los días siempre te acompañan y sabes que estarán ahí cuando lo necesites, a mis chavas. A mi cuadrillica de valencia (que no valenciana) por saber escucharme (sobre todo quejarme), por hacer de salvavidas en los días tristes y celebrar mis pequeñas victorias como si fueran el mayor de los éxitos.

A mis padres y mi hermana por su paciencia, pues soportar a un doctorando no es tarea sencilla. Porque sin vosotros no sería la persona que soy. A mi familia por confiar en mí más que yo misma, por ser mi respaldo y apoyo en todas las decisiones que he ido tomando y que quizás muchos no entenderían.

A todos aquellos que durante este tiempo han ayudado a que esta tesis sea una realidad y a los que, involuntariamente, pueda haber olvidado mencionar.

A todos, gracias.

RESUMEN

Introducción. El déficit de alfa-1 antitripsina (DAAT) es una condición genética rara que se caracteriza por unos niveles séricos bajos de la proteína (AAT), lo cual puede provocar enfermedad pulmonar y/o hepática. El DAAT está provocado por mutaciones en el gen *SERPINA1* siendo M la variante alélica que da lugar a la proteína funcional, mientras que S y Z son las variantes alélicas más comunes asociadas a esta condición. Más allá de su actividad antiproteasa, la AAT tiene propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras, por lo que el DAAT es considerado un trastorno proinflamatorio en el que los neutrófilos juegan un papel crucial, como demuestra la cantidad incrementada de neutrófilos en los pulmones de los pacientes con DAAT. La habilidad que presentan dichas células de dañar los tejidos adyacentes depende de su estado de activación. Una excesiva activación de los neutrófilos conduce a su degranulación, y por consiguiente liberación de proteasas, liberación de citoquinas proinflamatorias y producción de especies reactivas, lo cual contribuye al daño tisular. Los neutrófilos, así como otras células del sistema inmunitario, ejercen su función en focos de infección y/o inflamación donde se encuentran concentraciones de oxígeno bajas. Por lo tanto, parece relevante investigar el comportamiento de los neutrófilos procedentes de pacientes DAAT bajo condiciones de hipoxia.

Objetivos. Evaluar el efecto de la hipoxia sobre la activación de los neutrófilos en pacientes con DAAT y su comportamiento bajo

dichas condiciones, así como determinar si la terapia de reposición reduce dicha activación.

Metodología. Se aislaron neutrófilos a partir de sangre periférica de los sujetos de estudio mediante selección inmunomagnética negativa y se cultivaron, una parte de ellos bajo condiciones de hipoxia (1% O₂) y, otra parte, bajo condiciones de normoxia (21% O₂) durante 4 horas a 37°C. Trascurrido este tiempo se estimularon y activaron utilizando TNF- α (20 ng/ml, durante 30 minutos) y fMLP (100 nM, durante 10 minutos). Posteriormente, se determinaron la viabilidad celular y parámetros de degranulación, producción y liberación de citoquinas y perfil oxidativo.

Resultados. En esta tesis se ha ampliado el conocimiento del comportamiento, bajo condiciones de hipoxia, de los neutrófilos de pacientes con DAAT, tanto en edad pediátrica como adulta. En cuanto a las diferencias entre los pacientes y los voluntarios sanos, se ha observado que los neutrófilos procedentes de niños ZZ asintomáticos, incubados bajo condiciones de hipoxia (1% O₂) y activados con TNF- α y fMLP, presentan una mayor degranulación (gránulos primarios, secundarios y terciarios), un incremento en la producción de especies reactivas (ONOO⁻, H₂O₂ y NO), y mayor liberación de la citoquina proinflamatoria, IL-8, respecto a los procedentes de controles sanos. Además, los resultados muestran una reducción de la expresión a nivel de ARNm de la enzima CAT en los niños ZZ asintomáticos lo que explicaría la acumulación de H₂O₂. Por consiguiente, existe un daño oxidativo incrementado en los lípidos (ZZ) y en las proteínas (MZ, SZ y ZZ) en las células de niños con DAAT asintomáticos. En cuanto a los

neutrófilos de adultos, los procedentes de pacientes ZZ con EPOC, incubados en hipoxia y activados, también presentan un incremento en la liberación de los gránulos primarios (MPO) y mayor daño oxidativo en las proteínas. Estos resultados indican que el fenotipo de los neutrófilos de pacientes ZZ-AAT, asintomáticos o con EPOC, en ambiente hipóxico, son más agresivos que aquellos de voluntarios sanos, agravando el daño pulmonar en estos pacientes. Quizás para tratar de contrarrestar el daño oxidativo, los neutrófilos procedentes de adultos ZZ con EPOC, bajo hipoxia y activados presentan la expresión a nivel de ARNm de GPX1 elevada frente a la de los pacientes ZZ sin EPOC y la de los controles sanos MM.

Por otro lado, se analizaron las diferencias entre hipoxia y normoxia en la activación de los neutrófilos. La hipoxia induce un fenotipo más agresivo en los neutrófilos de niños ZZ asintomáticos: produce un incremento en su habilidad para liberar los gránulos primarios (MPO), citoquinas proinflamatorias (IL-8) y producción de H_2O_2 . En las células procedentes de adultos con DAAT (diferentes fenotipos) se observó un aumento en la expresión de diferentes enzimas antioxidantes, en los incubados al 1% O_2 respecto a los incubados al 21% O_2 .

La hipoxia produce mayor efecto en la liberación de AAT en los pacientes con DAAT que en los individuos sanos (ratio entre hipoxia y normoxia aumentado en neutrófilos ZZ-AAT frente a MM-AAT), lo cual sugiere un mecanismo de defensa frente al DAAT.

Además, se ha observado que los neutrófilos de pacientes ZZ adultos presentan una viabilidad reducida respecto a los procedentes de voluntarios sanos lo cual podría sugerir un mecanismo de protección.

Por último, los resultados acerca de la terapia de reposición parecen indicar una posible reducción de la generación de ROS y RNS. No se encontraron diferencias significativas en la degranulación de los neutrófilos incubados bajo condiciones de hipoxia o normoxia antes y después del tratamiento, que, de producirse, agravaría el daño pulmonar en el paciente. Sin embargo, se requiere ampliar el tamaño muestral para confirmar los hallazgos acerca de la terapia de reposición.

Conclusiones. La hipoxia induce un fenotipo más agresivo en los neutrófilos de pacientes DAAT con un incremento en su capacidad para liberar los gránulos de proteínas, producción y liberación de citoquinas proinflamatorias y de especies reactivas, lo que contribuiría a aumentar el daño tisular en los pacientes con DAAT.

ABREVIATURAS

8-OHdG	8-hidroxideoxiguanosina
AAT	Alfa-1 antitripsina
ALT	Alanina-aminotransferasa;
AST	Aspartato-aminotransferasa;
ATP	Adenosina trifosfato
BAL	Lavado broncoalvelolar
BSA	Albúmina sérica bovina
Ca ²⁺	Calcio
CAMs	Moléculas de adhesión celular
CAT	Catalasa
CEA	Células epiteliales alveolares
CEB	Células epiteliales bronquiales
CMFDA	5-clorometil fluorescein diacetato
CoMTB	Monocitos infectados con M. tuberculosis
CXCR1	Receptor de quimioquina con motivo C-X-C
DAAT	Déficit de alfa-1 antitripsina
DAF-FM	4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato
DAPI	6'-Diamidino-2-fenilindol dihidroclorido
DEM	Dietil maleato
DHR-123	Dihidrorodamina 123
DMSO	Dimetilsulfóxido

ELF	Líquido de revestimiento epitelial pulmonar
EN	Elastasa del neutrófilo
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
Fc	Fragmento cristalizable
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
FEV ₁	Volumen espiratorio forzado en 1 segundo;
FIHCUV-IIS INCLIVA	Fundación para la Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia-IIS INCLIVA
FTC	Fluoresceína-5-tiosemicarbazida
FVC	Capacidad vital forzada;
GGT	γ-glutamyl-transferasa.
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GPX	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H ₂ DCFDA	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HE	Dihidroetidina
HIF	Factor inducible por la hipoxia
HOCl	Ácido hipocloroso
HRP	Peroxidasa de rábano picante

IFC	<i>Integrated Fluidic Circuit</i>
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina-10
IL-1Ra	Antagonista del receptor de IL-1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina-8
IMC	Índice de masa corporal
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LPS	Lipopolisacárido
LTB4	Leucotrieno B4
MCB	Monoclorobimano
MDA	Malondialdehído
MIP-1 β	Proteína inflamatoria de macrófago 1- β
MIP-2	Proteína inflamatoria de macrófago 2
MMP-9	Metaloproteasa-9 de matriz
MPO	Mieloperoxidasa
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NO	Óxido nítrico
NOX	NADPH oxidasa
Nrf2	Factor nuclear derivado de eritroide 2
O ₂	Oxígeno
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OCl ⁻	Hipoclorito

OH•	Radical hidroxilo
ONOO⁻	Peroxinitrito
PAF	Factor activador de las plaquetas
PAR-1	Receptor-1 activado por la proteasa
PB	Plumbagina
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Proteína C-reactiva
PI	Ioduro de propidio
PMA	Forbol-miristato-acetato
PR3	Proteínasa 3
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RE	Retículo endoplasmático
RNS	Especies reactivas derivadas del nitrógeno
ROS	Especies reactivas derivadas del oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
t-BHP	Tertbutil hidroperóxido
TMB	3,3', 5,5'-tetrametilbencidina
TMRM	Tetrametil rodamina metilester
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
UCIM	Unidad Central de Investigación Médica
β2M	β -2-microglobulina

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Déficit de alfa-1 antitripsina	3
1.1.1. La proteína alfa-1 antitripsina	4
1.1.1.1. Gen y proteína.....	4
1.1.1.2. Síntesis y secreción.....	6
1.1.1.3. Funciones y propiedades.....	7
a) Inhibición de las proteasas	7
b) Papel inmunomodulador y antiinflamatorio	7
c) Papel antimicrobiano	8
d) Papel antiapoptótico	9
1.1.1.4. Herencia y variantes AAT	9
1.1.2. Fisiopatología del DAAT y manifestaciones clínicas	12
1.1.3. Tratamiento del DAAT	14
1.2. Sistema inmunitario y neutrófilos	15
1.2.1. Sistema inmunitario	15
1.2.2. Neutrófilos.....	16
1.2.2.1. Formación y reclutamiento	16
1.2.2.2. <i>Priming</i> y activación	17
1.2.2.3. Capacidad bactericida	19
1.2.3. Gránulos de los neutrófilos	21
a) Vesículas secretorias	22
b) Gránulos terciarios o de gelatinasa	22

c) Gránulos secundarios o específicos	23
d) Gránulos primarios o azurófilos	23
1.2.4. Estrés oxidativo	25
1.3. Papel de los neutrófilos en el DAAT	30
1.3.1. Acción a nivel pulmonar de los neutrófilos en el DAAT	32
1.3.1.1. Equilibrio proteasa-antiproteasa.....	32
1.3.1.2. Inflamación.....	34
1.3.1.3. Estrés oxidativo	35
1.3.1.4. Capacidad para eliminar bacterias	36
1.3.1.5. Efecto a nivel sistémico de los neutrófilos en el DAAT	37
1.4. Papel del estrés oxidativo en el DAAT	38
1.4.1. Estrés oxidativo a nivel hepático	38
1.4.2. Estrés oxidativo a nivel sistémico.....	39
1.5. Hipoxia	40
1.5.1. Requerimientos de oxígeno	40
1.5.2. Hipoxia fisiológica o patológica.....	40
1.5.3. Mecanismos de respuesta a la hipoxia: HIF ...	42
1.5.4. Neutrófilos bajo condiciones de hipoxia.....	43
1.5.4.1. Hipoxia, inflamación y neutrófilos.....	43
1.5.4.2. Efecto de la hipoxia en la degranulación de los neutrófilos.....	45
1.5.4.3. Efecto de la hipoxia en el estrés oxidativo en los neutrófilos.....	47

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
2.1. Justificación del estudio	51
2.2. Hipótesis	52
2.3. Objetivos	52
3. MATERIAL Y METODOS.....	55
3.1. Pacientes	57
3.1.1. Aspectos éticos	57
3.1.2. Anamnesis y evaluación general	58
3.1.3. Población de estudio	58
3.1.4. Cálculo del tamaño muestral	59
3.2. Toma de la muestra, aislamiento y cultivo de neutrófilos	60
3.3. Activación de los neutrófilos y almacenamiento de las muestras	62
3.4. Determinación de la degranulación de los neutrófilos y liberación de citoquinas	63
3.4.1. Determinación de la actividad elastasa	63
3.4.2. Determinación de la actividad mieloperoxidasa	64
3.4.3. Determinación de la concentración de lactoferrina	65
3.4.4. Determinación de la concentración de metaloproteasa-9 de matriz.....	66

3.4.5.	Determinación de la concentración de AAT ...	67
3.4.6.	Producción y secreción de citoquinas	68
3.4.7.	Determinación de la concentración de proteínas: Método de Bradford	69
3.5.	<i>Determinación del perfil oxidativo en los neutrófilos mediante citometría de flujo</i>	70
3.5.1.	Reactivos	70
a)	Detección de las especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS)	71
b)	Generación de especies reactivas derivadas del nitrógeno (RNS)	72
c)	Detección de tioles	72
d)	Función mitocondrial	72
e)	Calcio intracelular	73
f)	Daño oxidativo en las biomoléculas	73
g)	Viabilidad	74
3.5.2.	Marcaje fluorescente.....	75
3.5.2.1.	Medidas basales	75
3.5.2.2.	Controles positivos	76
3.5.3.	Ensayo de apoptosis	77
3.6.	<i>Determinación de la expresión a nivel de mRNA de los principales sistemas enzimáticos antioxidantes celulares.</i>	80
3.6.1.	Extracción de ARNm y retrotranscripción	81
3.6.2.	Preamplificación.....	81

3.6.3. Preparación previa de ensayos, muestras e IFC..	83
3.7. <i>Análisis estadístico</i>	86
4. RESULTADOS	89
4.1. <i>Pacientes</i>	91
4.1.1. Datos demográficos y clínicos de pacientes y controles en edad pediátrica.....	91
4.1.1. Datos demográficos y clínicos de pacientes y controles en edad adulta	92
4.2. <i>Pureza de los neutrófilos aislados</i>	99
4.3. <i>Viabilidad celular</i>	100
4.4. <i>Determinación de la degranulación de los neutrófilos procedentes de pacientes con DAAT</i>	105
4.4.1. Degranulación de los neutrófilos de pacientes y controles en la edad pediátrica	106
a) Liberación de AAT	106
b) Liberación de los gránulos primarios	108
c) Liberación de los gránulos secundarios.....	112
d) Liberación de los gránulos terciarios.....	114
4.4.2. Degranulación de los neutrófilos de pacientes y controles en edad adulta	116
a) Liberación de AAT	116
b) Liberación de los gránulos primarios	120

c)	Liberación de los gránulos secundarios.....	130
d)	Liberación de los gránulos terciarios.....	136
4.5. Determinación de la producción y secreción de citoquinas por los neutrófilos procedentes de pacientes con DAAT		
		141
4.5.1.	Producción y secreción de citoquinas en la edad pediátrica.....	142
4.5.1.	Producción y secreción de citoquinas en la edad	144
4.6. Determinación del calcio intracelular en neutrófilos procedentes de pacientes DAAT		
		150
4.6.1.	Determinación del calcio intracelular la edad pediátrica.....	150
4.6.2.	Determinación del calcio intracelular en edad adulta	152
4.7. Determinación del perfil oxidativo de los neutrófilos procedentes de pacientes con DAAT		
		156
4.7.1.	Perfil oxidativo en la edad pediátrica	156
a)	Producción de especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS)	156
b)	Producción de especies reactivas derivadas del nitrógeno (RNS)	162
c)	Función mitocondrial	164
d)	Daño oxidativo en las biomoléculas	166
4.7.2.	Perfil oxidativo en la edad adulta.....	170

a) Producción de especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS)	170
b) Producción de especies reactivas derivadas del nitrógeno (RNS)	180
c) Función mitocondrial	184
d) Daño oxidativo en las biomoléculas	192
4.8. Determinación de la defensa antioxidante en pacientes con DAAT	200
4.8.1. Detección de antioxidantes no enzimáticos en los pacientes con DAAT.....	200
4.8.1.1. Detección de tioles intracelulares en la edad pediátrica.....	200
4.8.1.2. Detección de tioles en los pacientes con DAAT en la edad adulta.....	204
4.8.2. Determinación de la expresión de genes antioxidantes en los pacientes con DAAT	212
4.8.2.1. Expresión de enzimas antioxidantes en la edad pediátrica.....	212
4.8.2.2. Expresión de enzimas antioxidantes en la edad adulta.....	224
5. DISCUSIÓN.....	251
5.1. Consideraciones generales de la muestra	254
5.2. Efecto de la hipoxia en la viabilidad celular de neutrófilos procedentes de pacientes DAAT	256
5.3. Efecto de la hipoxia en la degranulación de los neutrófilos procedentes de los pacientes con DAAT	257

5.4. Efecto de la hipoxia en la producción y secreción de citoquinas por los neutrófilos procedentes de los pacientes con DAAT	264
5.5. Efecto de la hipoxia en los niveles de calcio intracelular de los neutrófilos procedentes de los pacientes con DAAT	266
5.6. Efecto de la hipoxia en el perfil oxidativo de los neutrófilos procedentes de los pacientes con DAAT	267
5.6.1. Especies reactivas.....	268
5.6.2. Efecto de la hipoxia en la defensa antioxidante de los neutrófilos procedentes de los pacientes con DAAT	272
5.7. Limitaciones y relevancia del estudio	276
6. CONCLUSIONES	277
7. BIBLIOGRAFÍA	283
8. TRABAJOS DERIVADOS	309
8.1. Trabajos publicados	311
8.2. Posters presentados en congresos	313
9. ANEXOS	317

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i>	<i>Estructura molecular de la AAT.....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 2.</i>	<i>Esquema general de la fisiopatología del DAAT...</i>	<i>13</i>
<i>Figura 3.</i>	<i>Esquema estado inactivado-activado del neutrófilo.</i>	<i>18</i>
<i>Figura 4.</i>	<i>Principales ROS y mecanismos antioxidantes celulares.</i>	<i>29</i>
<i>Figura 5.</i>	<i>192.24 Dynamic Array™ integrated fluidic circuit</i>	<i>85</i>
<i>Figura 6.</i>	<i>Esquema general de los métodos utilizados. ...</i>	<i>88</i>
<i>Figura 7.</i>	<i>Pureza del cultivo de neutrófilos tras el aislamiento mediante selección inmunomagnética negativa determinado mediante citometría de flujo.</i>	<i>99</i>
<i>Figura 8.</i>	<i>Células vivas en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica.</i>	<i>101</i>
<i>Figura 9.</i>	<i>Células vivas en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta.</i>	<i>103</i>
<i>Figura 10.</i>	<i>Células vivas en pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta.</i>	<i>104</i>
<i>Figura 11.</i>	<i>Niveles de AAT en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica.</i>	<i>107</i>

<i>Figura 12. Actividad EN en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica.....</i>	<i>109</i>
<i>Figura 13. Actividad peroxidasa de la MPO en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica.....</i>	<i>111</i>
<i>Figura 14. Niveles de lactoferrina en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica.....</i>	<i>113</i>
<i>Figura 15. Niveles de MMP-9 en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica.....</i>	<i>115</i>
<i>Figura 16. Niveles de AAT en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta.....</i>	<i>117</i>
<i>Figura 17. Niveles de AAT en los pacientes ZZ con terapia de reposición.....</i>	<i>119</i>
<i>Figura 18. Actividad elastasa en los pacientes DAAT y en los controles en edad adulta.....</i>	<i>121</i>
<i>Figura 19. Actividad EN en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta.....</i>	<i>122</i>
<i>Figura 20. Determinación de la actividad EN en los pacientes ZZ con terapia de reposición.....</i>	<i>123</i>
<i>Figura 21. Actividad peroxidasa de la MPO en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta.....</i>	<i>125</i>
<i>Figura 22. Actividad peroxidasa de la MPO en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta.....</i>	<i>127</i>
<i>Figura 23. Determinación de la actividad peroxidasa de la MPO en los pacientes ZZ con terapia de reposición.....</i>	<i>128</i>

<i>Figura 24. Niveles de lactoferrina en los pacientes con DAAT en edad adulta.....</i>	<i>131</i>
<i>Figura 25. Niveles de lactoferrina en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en controles en edad adulta.</i>	<i>133</i>
<i>Figura 26. Determinación de la presencia de lactoferrina en los pacientes ZZ con terapia de reposición.....</i>	<i>135</i>
<i>Figura 27. Niveles de MMP-9 en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta.....</i>	<i>137</i>
<i>Figura 28. Niveles de MMP-9 en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta.</i>	<i>139</i>
<i>Figura 29. Niveles de MMP-9 en los pacientes ZZ con terapia de reposición..</i>	<i>140</i>
<i>Figura 30. Niveles de IL-8 en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica.....</i>	<i>143</i>
<i>Figura 31. Niveles de IL-8 en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta.</i>	<i>145</i>
<i>Figura 32. Niveles de TNF-α en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta.</i>	<i>147</i>
<i>Figura 33. Niveles de TNF-α en los pacientes ZZ con terapia de reposición..</i>	<i>149</i>
<i>Figura 34. Niveles de Ca²⁺ intracelular en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica.</i>	<i>151</i>
<i>Figura 35. Niveles de Ca²⁺ intracelular en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta.....</i>	<i>152</i>

<i>Figura 36. Niveles de Ca^{2+} intracelular en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta.</i>	<i>153</i>
<i>Figura 37. Niveles de Ca^{2+} intracelular en los pacientes ZZ con terapia de reposición.</i>	<i>155</i>
<i>Figura 38. Niveles de $ONOO^-$ en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica.</i>	<i>157</i>
<i>Figura 39. Niveles de H_2O_2 en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica.</i>	<i>159</i>
<i>Figura 40. Niveles del anión O_2^- en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica.</i>	<i>161</i>
<i>Figura 41. Niveles de NO en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica.</i>	<i>163</i>
<i>Figura 42. Niveles de O_2^- mitocondrial en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica.</i>	<i>164</i>
<i>Figura 43. Potencial de membrana mitocondrial en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica.</i>	<i>165</i>
<i>Figura 44. Niveles de proteínas carboniladas en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica.</i>	<i>167</i>
<i>Figura 45. Niveles de lípidos peroxidados en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica.</i>	<i>169</i>
<i>Figura 46. Niveles de $ONOO^-$ en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta.</i>	<i>171</i>
<i>Figura 47. Niveles de $ONOO^-$ en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta.</i>	<i>172</i>

<i>Figura 48. Niveles de ONOO⁻ en los pacientes ZZ con terapia de reposición..</i>	<i>173</i>
<i>Figura 49. Niveles de H₂O₂ en los pacientes con DAAT y en controles en edad adulta..</i>	<i>174</i>
<i>Figura 50. Niveles de H₂O₂ en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles.</i>	<i>175</i>
<i>Figura 51. Niveles de H₂O₂ en los pacientes ZZ con terapia de reposición.</i>	<i>176</i>
<i>Figura 52. Niveles del anión O₂⁻ en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta.</i>	<i>177</i>
<i>Figura 53. Niveles de anión O₂⁻ en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles.</i>	<i>178</i>
<i>Figura 54. Niveles de O₂⁻ en los pacientes ZZ con terapia de reposición.</i>	<i>179</i>
<i>Figura 55. Niveles de NO en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta</i>	<i>181</i>
<i>Figura 56. Niveles de NO en pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles.</i>	<i>182</i>
<i>Figura 57. Niveles de NO en los pacientes ZZ con terapia de reposición.</i>	<i>183</i>
<i>Figura 58. Niveles de anión O₂⁻ mitocondrial en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta..</i>	<i>185</i>
<i>Figura 59. Niveles de anión O₂⁻ mitocondrial en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta.....</i>	<i>186</i>

<i>Figura 60. Niveles de O₂⁻ mitocondrial en los pacientes ZZ con terapia de reposición.....</i>	<i>187</i>
<i>Figura 61. Potencial de membrana mitocondrial en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta..</i>	<i>188</i>
<i>Figura 62. Potencial de membrana mitocondrial en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta.....</i>	<i>189</i>
<i>Figura 63. Niveles de potencial de membrana mitocondrial en los pacientes ZZ con terapia de reposición.....</i>	<i>191</i>
<i>Figura 64. Niveles de proteínas carboniladas en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta..</i>	<i>193</i>
<i>Figura 65. Niveles de proteínas carboniladas en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta.....</i>	<i>195</i>
<i>Figura 66. Niveles de proteínas carboniladas en los pacientes ZZ con terapia de reposición..</i>	<i>196</i>
<i>Figura 67. Niveles de lípidos peroxidados en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta.....</i>	<i>197</i>
<i>Figura 68. Niveles de lípidos peroxidados en los pacientes ZZ, con o sin EPOC y en los controles en edad adulta.....</i>	<i>198</i>
<i>Figura 69. Niveles de lípidos peroxidados en los pacientes ZZ con terapia de reposición.....</i>	<i>199</i>
<i>Figura 70. Niveles de tioles reducidos en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica.</i>	<i>201</i>
<i>Figura 71. Niveles de GSH en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica.....</i>	<i>203</i>

<i>Figura 72. Niveles de tioles reducidos en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta.....</i>	<i>205</i>
<i>Figura 73. Niveles de tioles en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta.</i>	<i>206</i>
<i>Figura 74. Niveles de tioles reducidos en los pacientes ZZ con terapia de reposición.....</i>	<i>207</i>
<i>Figura 75. Niveles de GSH en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta.</i>	<i>209</i>
<i>Figura 76. Niveles de GSH en pacientes ZZ, con o sin EPOC y en los controles en edad adulta.....</i>	<i>210</i>
<i>Figura 77. Niveles de GSH en los pacientes ZZ con terapia de reposición.</i>	<i>211</i>
<i>Figura 78. Niveles de expresión del gen SOD citosólica en los pacientes y en los controles en edad pediátrica.</i>	<i>213</i>
<i>Figura 79. Niveles de expresión del gen que codifica para la SOD mitocondrial en los pacientes y en los controles en edad pediátrica.</i>	<i>215</i>
<i>Figura 80. Niveles de expresión del gen que codifica para el Nrf2 en los pacientes y en los controles en edad pediátrica.</i>	<i>217</i>
<i>Figura 81. Niveles de expresión del gen que codifica para la CAT en los pacientes y en los controles en edad pediátrica.....</i>	<i>219</i>
<i>Figura 82. Niveles de expresión del gen de la glutatión peroxidasa en los pacientes y en los controles en edad pediátrica. . .</i>	<i>221</i>

Figura 83. Niveles de expresión del gen que codifica para la glutatión reductasa en los pacientes y en los controles en edad pediátrica. .	223
Figura 84. Niveles de expresión del gen que codifica para la SOD citosólica en los pacientes y en los controles en la edad adulta. .	225
Figura 85. Niveles de expresión del gen que codifica para la SOD citosólica en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta.	227
Figura 86. Niveles de expresión del gen que codifica para la SOD citosólica en pacientes ZZ con terapia de reposición.....	228
Figura 87. Niveles de expresión del gen que codifica para la SOD mitocondrial en los pacientes y en los controles en la edad adulta.	229
Figura 88. Niveles de expresión del gen que codifica para la SOD mitocondrial en los pacientes ZZ, con o sin EPOC y en los controles en edad adulta..	230
Figura 89. Niveles de expresión del gen que codifica para la SOD mitocondrial en los pacientes ZZ con terapia de reposición..	231
Figura 90. Niveles de expresión del gen que codifica para el factor de transcripción Nrf2 en los neutrófilos de los pacientes y en los controles en edad adulta.	233
Figura 91. Niveles de expresión del gen que codifica para el factor de transcripción Nrf2 en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta.	234

Figura 92. Niveles de expresión del gen que codifica para el factor de transcripción Nrf2 en los pacientes ZZ con terapia de reposición.	235
Figura 93. Niveles de expresión del gen que codifica para la CAT en los pacientes y en los controles en edad adulta.	237
Figura 94. Niveles de expresión del gen que codifica para la CAT en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta.	238
Figura 95. Niveles de expresión del gen que codifica para la CAT en los pacientes ZZ con terapia de reposición.	239
Figura 96. Niveles de expresión del gen que codifica para la glutatión peroxidasa en los pacientes y en los controles en edad adulta.	241
Figura 97. Niveles de expresión del gen que codifica para la GPX1 en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta.	243
Figura 98. Niveles de expresión del gen que codifica para la GPX1 en los pacientes ZZ con terapia de reposición.	245
Figura 99. Niveles de expresión del gen que codifica para la glutatión reductasa en pacientes y controles en edad adulta.	247
Figura 100. Niveles de expresión del gen que codifica para la GR en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta.	248

Figura 101. Niveles de expresión del gen que codifica para la GR en los pacientes ZZ con terapia de reposición..... 249

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen del método de análisis por citometría de flujo	78
Tabla 2. Programa de preamplificación	82
Tabla 3. Genes testados mediante q-RT-PCR..	84
Tabla 4. Programa q-RT-PCR	86
Tabla 5. Datos demográficos y clínicos de pacientes y controles en edad pediátrica.....	94
Tabla 6. Datos demográficos y clínicos de pacientes y controles en edad adulta.	96

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1. Déficit de alfa-1 antitripsina

El déficit de alfa-1 antitripsina (DAAT) es una condición hereditaria derivada de mutaciones en el gen *SERPINA1* que codifica la proteína alfa-1 antitripsina (AAT). Es un trastorno monogénico complejo ya que, a partir de una misma mutación genética, presenta una gran variabilidad en las manifestaciones clínicas. De este modo, predispone a la aparición de ciertas condiciones respiratorias como el enfisema pulmonar; hepáticas, como la cirrosis hepática y, con menor frecuencia, a otras enfermedades como la pancreatitis neutrofílica o la vasculitis sistémica ANCA+. Las mutaciones más comunes relacionadas con esta entidad son Pi*Z y Pi*S siendo Pi*M la variante que codifica la proteína funcional (1).

El DAAT presenta una prevalencia de 1-5 casos por cada 10.000 individuos (ORPHA:60), por lo que se enmarca dentro de las denominadas enfermedades raras (EERR). Este término hace referencia a un grupo de enfermedades metabólicas hereditarias caracterizadas, tanto individualmente como en su conjunto, por una baja prevalencia y una sintomatología muy heterogénea. En consecuencia, su diagnóstico, pronóstico y tratamiento son muy complejos. Se estima que existen entre 5000 y 8000 enfermedades raras. A nivel mundial, se estima que más de 260 millones de personas presentan una EERR, de las cuales entre 18 y 30 millones se encuentran en la Unión Europea y alrededor de 3 millones en España, lo que supone un importante problema de salud pública (2).

INTRODUCCIÓN

1.1.1. La proteína alfa-1 antitripsina

1.1.1.1. Gen y proteína

La proteína AAT, alfa-1 proteinasa inhibidor (α 1-Pi) o SERPINA1 (Serine Protease Inhibitor, grupo A, miembro 1), es una glicoproteína circulante e hidrosoluble codificada por el gen *SERPINA1*.

Dicho gen presenta un tamaño de 12,2 Kb y se encuentra localizado en el extremo distal del cromosoma 14 (posición q31-32,3), compartiendo *locus* con otros genes codificantes de las serpinas. Está compuesto por 7 exones denominados IA, IB, IC, II, III, IV y V y 6 intrones. Los exones II-V constituyen la parte codificadora de la proteína, mientras que IA, IB, IC son la región promotora reguladora del inicio de transcripción (3,4).

La AAT es un reactante de fase aguda y su expresión se induce principalmente por productos del estrés nitrooxidativo y de procesos inflamatorios e infecciosos, como la endotoxina bacteriana o lipopolisacárido (LPS); el interferón β o las citoquinas interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) (5). De manera similar, se ha observado la activación de la transcripción del gen *SERPINA1* a través de mecanismos relacionados con el equilibrio proteasa-antiproteasa, por ejemplo mediante serin-proteasas, complejos AAT-elastasa o péptidos cortos desprendidos de los complejos AAT-elastasa tras ser hidrolizados (6).

INTRODUCCIÓN

Inicialmente, al ser sintetizada, la AAT inmadura presenta 418 aminoácidos. Posteriormente pierde el péptido de señalización dando lugar a la proteína madura de 394 aminoácidos. Finalmente, tras ser glicosilada en el aparato de Golgi, en tres residuos de asparagina en las posiciones 46, 83 y 247, es empaquetada en unas vesículas secretorias y liberada al torrente sanguíneo. La forma madura es una glicoproteína de tamaño medio (6.7 x 3.2 nm) con un peso molecular de 52 kDa y con una vida media corta de entre 4-5 días (7,8).

La molécula tiene una estructura tridimensional globular, organizada en 9 hélices α (A-I) y 15 láminas β (A1-5, B1-B6, C1-4), de la que sobresale un bucle móvil que contiene el centro activo, constituido por una metionina y una serina en posición 358 y 359, que es el que facilita su interacción con los sustratos. En la estructura de la molécula destacan dos zonas de especial interés, denominadas brecha y postigo (*breach* y *shutter*), que son los lugares dónde se suelen localizar los cambios conformacionales más importantes de la AAT que modifican sus propiedades y funciones (9) (Figura 1).

INTRODUCCIÓN

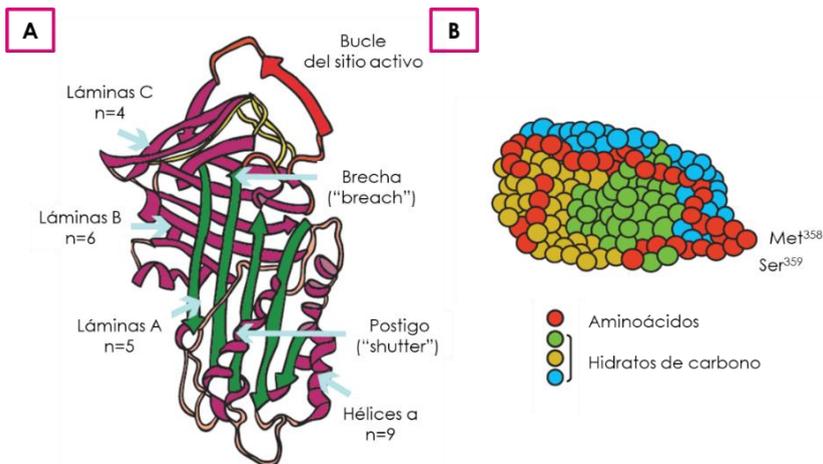


Figura 1. Estructura molecular de la AAT. A) Estructura tridimensional de la AAT, formada por hélices α y láminas β , mientras el bucle móvil del sitio activo se encuentra expuesto. B) Representación de la superficie de la AAT. La cadena de aminoácidos (esferas rojas) se encuentra rodeada por hidratos de carbono (esferas verdes, amarillas y azules), mientras que el sitio activo formado por Met³⁵⁸ y Ser³⁵⁹ sobresale del contorno globular.

1.1.1.2. Síntesis y secreción

La proteína AAT es sintetizada y secretada principalmente por los hepatocitos (80% aproximadamente) y en menor cantidad por otros tipos celulares (20% aproximadamente), como los monocitos, los macrófagos, las células pancreáticas, las células epiteliales alveolares (CEA), los enterocitos o los neutrófilos (4,10,11).

En el organismo se producen 34mg/Kg/día de AAT en situación basal, lo que supone una concentración plasmática de AAT (1-2g/L). Sin embargo, bajo estímulos inflamatorios o infecciosos, sus niveles plasmáticos pueden multiplicarse de 2 a 6 veces rápidamente, para

INTRODUCCIÓN

contrarrestar la acción de las proteasas liberadas por las células activadas, neutrófilos principalmente, en el proceso infeccioso (12).

1.1.1.3. Funciones y propiedades

a) Inhibición de las proteasas

La función principal de la AAT consiste en neutralizar diversas proteasas secretadas por los neutrófilos, entre las cuales destaca una serín-proteasa, la elastasa del neutrófilo (EN), con la que reacciona con una de las constantes de asociación más elevadas conocidas en biología ($k = 6.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Asimismo, también es capaz de inhibir la acción de otras serín-proteasas secretadas tanto por los neutrófilos (proteínasa 3 (PR3), catepsina G, mieloperoxidasa (MPO) o α -defensinas), como por otros tipos celulares (13). Además de las serín-proteasas extracelulares, la AAT también puede neutralizar otras serín-proteasas de membrana y algunas cisteín-proteasas y metaloproteasas intracelulares como ADAM17 (14–16). Cabe destacar que la AAT confiere el 90% de la capacidad antiproteasa al suero.

b) Papel inmunomodulador y antiinflamatorio

Además de su actividad antiproteasa, se ha demostrado que la AAT presenta propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias importantes. Aunque consigue reducir la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6, interleucina-8 (IL-8), y TNF- α . Sin embargo, no suprime la producción de las citoquinas antiinflamatorias interleucina-10 (IL-10) y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra)

INTRODUCCIÓN

(17). Además, puede bloquear directamente la IL-8, una de las principales citoquinas quimioatrayentes de neutrófilos, formando el complejo AAT-IL-8 (14).

Estudios *in vitro* han demostrado que la AAT también es capaz de inhibir la producción de óxido nítrico (NO) (gas liberado por los neutrófilos, entre otras células expuestas a procesos inflamatorios). Asimismo, estudios *in vivo* en pacientes con DAAT han detectado una mayor cantidad de NO exhalado en ellos que en los controles sanos (18).

La AAT tiene un elevado poder antioxidante debido a su alto contenido en metionina: Es capaz de eliminar directamente una gran variedad de oxidantes que al reaccionar rápidamente con dichos residuos dan lugar a sulfóxido de metionina, que puede ser reducida de nuevo a metionina por la metionina sulfóxido reductasa (19). La AAT es capaz de disminuir la producción del anión superóxido (O_2^-) por el neutrófilo (20) e inducir la catalasa (CAT). Además, en condiciones inflamatorias, la nitrosilación del residuo Cys²³² de la molécula por NO incrementa su capacidad inhibitoria frente a algunas proteasas bacterianas (21).

c) Papel antimicrobiano

La actividad antimicrobiana de la AAT se demuestra al evitar que diversos microorganismos se unan a las células huésped, inhibiendo su replicación e infectividad, aunque bajo condiciones de inflamación pierde algo de eficacia ya que ciertos oxidantes (22) y

INTRODUCCIÓN

metaloproteinasas (23) la inactivan. Se ha observado también que, posiblemente, gracias a la neutralización de las serín-proteasas, posee actividad bacteriostática frente a numerosas bacterias (24–26) y protozoos (27–29).

d) Papel antiapoptótico

Además de las múltiples funciones mencionadas anteriormente, la AAT también protege frente a la apoptosis. Dicha proteína inhibe las caspasas 1 y 3 previniendo la muerte celular de las células alveolares y endoteliales pulmonares, de las células beta del páncreas, de los cardiomiocitos y de los fibroblastos cutáneos (30,31).

1.1.1.4. Herencia y variantes AAT

El gen *SERPINA1* es altamente polimórfico. Se han descrito alrededor de 120 variantes del gen, clasificadas en: i) normales, que son aquellas que expresan niveles fisiológicos de la proteína funcional, e ii) deficientes, en las que los niveles plasmáticos se ven disminuidos o la función de la proteína está alterada. Estas últimas, a su vez, según su frecuencia y las concentraciones séricas a las que dan lugar, se dividen en deficientes frecuentes, deficientes “raras” y deficientes nulas. El gen *SERPINA1* consta de dos alelos que siguen un patrón de herencia autosómico codominante, lo que implica que cada alelo contribuye en un 50% a la producción de AAT (8).

El alelo normal M, se encuentra en más del 95% de la población de origen caucásico y expresa el 100% de la AAT. Los alelos

INTRODUCCIÓN

deficitarios más frecuentes son el S y Z, se presentan en el 10% y 2% de la población española respectivamente y expresan el 40% y 15% de la AAT. De esta manera, los individuos con genotipo MM expresarían el 100% de la AAT en sangre, mientras que los MS, SS, MZ, SZ y ZZ expresan aproximadamente 80, 60, 55, 40 y 15% respectivamente (32,33).

La mutación S se produce por un cambio de nucleótidos en el exón III, en el que el triplete normal GAA (Guanina-Adenosina-Adenosina) se convierte en GTA (Guanina-Timina-Adenosina), lo que se traduce en un cambio de ácido glutámico a valina en la posición 264 (GAA Glu²⁶⁴ → GTA Val²⁶⁴) de la cadena, situada en la parte denominada postigo de la proteína, descrita anteriormente. Dicha ubicación, lejos del sitio activo, hace que se produzcan cambios menos severos en la estructura de la proteína y que ésta mantenga parte de su actividad catalítica (34). Por otra parte, no hay evidencia de polimerización, únicamente de dimerización, lo que impide su acumulación en el retículo endoplásmico (RE), sin embargo, la alteración estructural da lugar a una proteína inestable que será degradada fuera del hepatocito reduciendo la vida media de la proteína ATT-S y, por lo tanto, los niveles de plasmáticos de dicha proteína (3,35).

La mutación Z causa en algunos pacientes, síntomas más graves. En este caso, el cambio nucleotídico ocurre en el exón V, normalmente expresado como AAG (adenina-adenina-guanina), y muta a GAG (guanina-Adenina-guanina). Como consecuencia, el ácido glutámico en la posición 342 cambia a lisina (GAG Glu³⁴² → AAG Lys³⁴²)

INTRODUCCIÓN

produciendo cambios drásticos en la región de la brecha de la proteína descrita anteriormente. Este cambio de aminoácidos ocurre en la base del sitio activo y, debido al mismo, los enlaces de hidrógeno rotos causan un ensanchamiento pronunciado tanto de la brecha como del postigo, disminuyendo la estabilidad de la proteína y dando lugar a efectos patológicos (9,36,37). Los más graves se observan cuando la estabilidad de la proteína aumenta por dimerización o, en los pacientes homocigotos ZZ, debido a la polimerización. Estos agregados son insolubles, por lo que la mayoría de la AAT queda retenida en el RE y no se libera al torrente sanguíneo, provocando una reducción de la concentración plasmática de la proteína. Además, al verse afectado el sitio activo, no solo se reduce la concentración plasmática de la AAT, sino que la proteína pierde el 80% de su actividad biológica (38).

Existen aproximadamente 25 alelos deficientes raros los cuales expresan alrededor de un 15% de la AAT en el suero. Los alelos deficientes producen proteínas anormales que, al igual que el alelo Z, pueden polimerizar formando acúmulos que quedan retenidos en el interior de los hepatocitos, o degradarse intracelularmente, lo que, en ambos casos, condiciona unos niveles plasmáticos de AAT bajos, insuficientes para hacer frente a las proteasas liberadas por los neutrófilos. Por otro lado, se encuentran las variantes nulas que, aunque son muy poco frecuentes, son extremadamente peligrosas ya que producen una cantidad prácticamente indetectable de AAT (menos del 1%) en el plasma. Estas variantes presentan un alto riesgo de desarrollo de enfisema pulmonar, pero, al no formar polímeros, no se relacionan con hepatopatías.

INTRODUCCIÓN

1.1.2. Fisiopatología del DAAT y manifestaciones clínicas

El DAAT puede provocar daño tisular principalmente a través de dos mecanismos. Por un lado, puede producir diversas hepatopatías ya que las mutaciones en la AAT dificultan el plegamiento correcto de la molécula y consecuentemente, tal como se ha comentado anteriormente, el inicio de su polimerización en el retículo endoplasmático (RE) de las células productoras, predominantemente los hepatocitos. El fenómeno de la polimerización no es homogéneo en la totalidad del hígado, pues mientras que algunos hepatocitos pueden presentar escasos polímeros, en otros, los acúmulos pueden ser grandes, dando lugar a la formación de cuerpos de inclusión, que pueden desencadenar estrés en el RE, y activar la cascada de las caspasas estimulando la apoptosis y la autofagia. En algunos pacientes esto produce una inflamación crónica en el hígado que puede desembocar en el desarrollo de enfermedades hepáticas graves como fibrosis, cirrosis o hepatocarcinoma (9,35,39).

Por otra parte, la retención de la AAT en el hígado puede producir enfermedad pulmonar. Los pacientes con DAAT tienen unos niveles séricos bajos de la proteína, lo que se traduce en la ausencia o reducción de los niveles de AAT en el órgano diana, el pulmón. Esto genera, en este órgano un desequilibrio proteasa-antiproteasa y, consecuentemente, una disminución en la capacidad de estos pacientes para inhibir la EN, dando lugar a la destrucción del

INTRODUCCIÓN

parénquima pulmonar y al posible desarrollo de una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). A su vez, los polímeros promueven la quimiotaxis de los neutrófilos lo que agrava el daño pulmonar provocado por los procesos inflamatorios. La principal manifestación clínica respiratoria es el enfisema pulmonar (38). La enfermedad pulmonar además se ve exacerbada por el consumo de tabaco, ambientes contaminantes o por la exposición prolongada al polvo o al humo en entornos laborales (40).

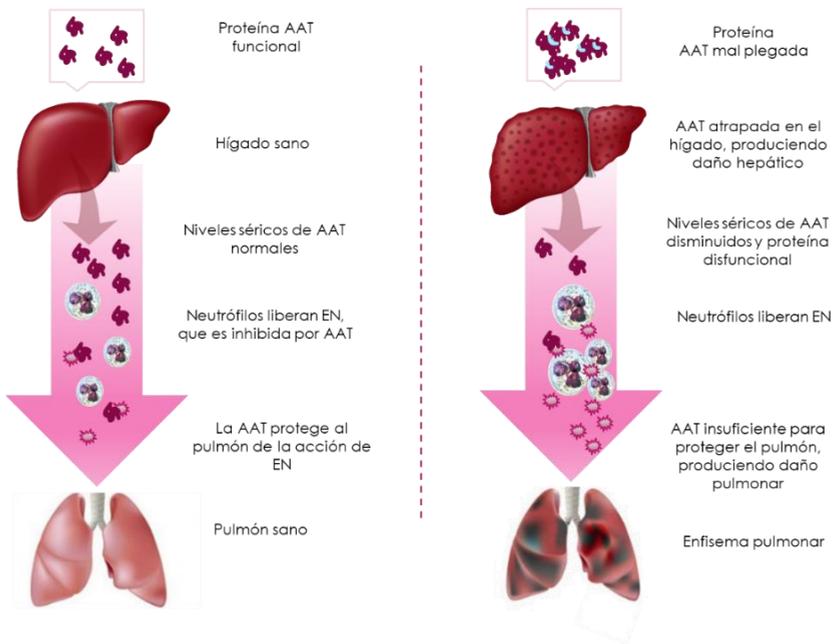


Figura 2. Esquema general de la fisiopatología del DAAT.
Elaboración propia.

INTRODUCCIÓN

1.1.3. Tratamiento del DAAT

Más allá del trasplante hepático, no existe un tratamiento específico para la enfermedad hepática causada por el DAAT, por lo que se trata de prevenir las posibles complicaciones hasta que la progresión del daño amenace la vida del paciente, siendo entonces cuando está recomendado el trasplante hepático (41). Se recomienda un estilo de vida saludable así como limitar o evitar situaciones que puedan afectar al hígado como la obesidad, el consumo crónico de antiinflamatorios no esteroideos, la exposición activa o pasiva al tabaco o la ingesta de alcohol (42,43).

Sin embargo, existe un tratamiento específico para la enfermedad pulmonar, la terapia de reposición, que estaría indicada para pacientes con niveles séricos menores de 11 μM y enfisema pulmonar grave (44). La terapia de reposición, consiste en la infusión regular intravenosa de la proteína AAT purificada a partir de la sangre de donantes sanos, con lo que se incrementan los niveles plasmáticos de la proteína activa, y consecuentemente sus niveles en el pulmón protegiéndolo de la acción de las proteasas liberadas por los neutrófilos.

Existe cierta controversia en cuanto a dicho tratamiento ya que, aunque consigue aumentar la concentración plasmática de AAT, la reducción de la morbilidad y la mejora de la supervivencia no resultan tan evidentes. Sin embargo, ciertos ensayos aleatorizados controlados con placebo, siendo el de mayor relevancia el ensayo RAPID (*Randomised trial of augmentation therapy in alpha-1*

INTRODUCCIÓN

proteinase inhibitor deficiency) (45), han demostrado su eficacia clínica, retrasando la progresión del enfisema y aumentando la supervivencia de los pacientes (46).

1.2. Sistema inmunitario y neutrófilos

1.2.1. Sistema inmunitario

El sistema inmunitario no es más que el mecanismo defensivo que poseen los organismos frente a los agentes externos que pueden atacarles. Cuenta con dos líneas de defensa. La primera de ellas la constituyen las barreras físicas, entre las que se encuentran la piel, las mucosas de la superficie epitelial del intestino y de los pulmones y el pH estomacal ácido. La segunda es el componente celular, constituido por una red compleja formada por células y moléculas, que permiten mantener la homeostasis frente a las agresiones externas de microorganismos patógenos o sustancias extrañas, que, a su vez, para que el sistema funcione eficazmente, deben ser perfectamente reconocidos y diferenciados de los tejidos y proteínas del propio organismo. Al mismo tiempo, este segundo componente se puede dividir en dos partes: la inmunidad innata (natural o inespecífica) y la inmunidad adquirida (adaptativa o específica), con tan gran interacción entre sí que son capaces de suministrar una respuesta determinada frente a cada agente infeccioso. La inmunidad innata es inmediata pero inespecífica y está constituida principalmente por los fagocitos (monocitos, macrófagos y neutrófilos) -que fagocitan y destruyen a los patógenos-, las células asesinas naturales que

INTRODUCCIÓN

identifican y destruyen a las células infectadas del hospedador y, por último, el sistema del complemento, que -entre otras funciones- es capaz de activar a los leucocitos y desarrollar la quimiotaxis. Las células dendríticas son el nexo entre la inmunidad innata y la adaptativa; son las encargadas de procesar a los antígenos para presentarlos a los linfocitos B adaptativos y a los linfocitos T. El sistema inmune adaptativo es capaz de generar una respuesta muy específica mediante el reconocimiento de cada patógeno, desencadenando así la producción de anticuerpos y la respuesta de las células T citotóxicas. Aunque es un proceso más lento que la respuesta innata, genera memoria inmunológica lo que aumenta su rapidez y eficacia si se enfrenta posteriormente con el mismo patógeno (47,48).

1.2.2. Neutrófilos

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en la circulación y los principales elementos defensivos de la inmunidad innata; son el primer tipo celular en llegar a los lugares de infección e inflamación donde desempeñan un papel crucial en la defensa del huésped frente a los patógenos microbianos, mediante la fagocitosis, destrucción y digestión de bacterias y hongos.

1.2.2.1. Formación y reclutamiento

Los neutrófilos se generan en la médula ósea, desde la cual una pequeña parte es liberada a la circulación donde desarrollan sus funciones en condiciones normales. Una vez en el torrente sanguíneo,

INTRODUCCIÓN

su vida media es muy corta de 6 a 8 horas, tras las cuales son rápidamente eliminados por los macrófagos. Sin embargo, durante los procesos inflamatorios, tanto su producción como su liberación se ven aumentadas. Estas células poseen diversos receptores de superficie, implicados en la respuesta frente a la invasión microbiana, lo que les permite detectar quimioatrayentes solubles. Algunas de las señales proinflamatorias y quimioatrayentes más potentes de los neutrófilos son el TNF- α y la IL-8. Se trata además de células altamente móviles, ya que su consistencia gelatinosa hace que puedan atravesar las paredes de los vasos sanguíneos fácilmente. Además, mediante la quimiotaxis pueden detectar el foco de infección y mediante un fenómeno conocido como diapédesis, se unen al endotelio y migran hacia los tejidos intersticiales hasta alcanzar el foco de infección donde llevan a cabo sus funciones, ayudando a la destrucción de los patógenos.

1.2.2.2. *Priming* y activación

Los neutrófilos son células relativamente inactivas o quiescentes, evitando así la activación inespecífica; sin embargo, el proceso denominado "*priming*" o preactivación, les confiere un fenotipo más agresivo (49). Un amplio rango de mediadores inflamatorios pueden inducir este estado de preactivación, entre ellos el TNF- α (50), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (51), el factor activador de las plaquetas (PAF) (52) o el LPS (53). Este proceso ocurre rápidamente, en segundos o minutos, según el ligando e interviene en múltiples procedimientos

INTRODUCCIÓN

como la capacidad de adhesión (54), el estallido oxidativo (50,53) o la degranulación (55) de los neutrófilos. Este fenómeno se cree que ocurre en la circulación previamente al reclutamiento de los neutrófilos y extravasación al foco de la infección (56).

Para que se produzca la liberación del contenido de los gránulos neutrofilicos no solo es necesario un estímulo de *priming*, sino que este estado de preactivación le otorga una mayor disposición a responder a un segundo estímulo y alcanzar así, la activación completa. En condiciones fisiológicas, este mecanismo mejora la protección frente a los patógenos; sin embargo, en enfermedades inflamatorias, como el DAAT, puede dar lugar a un agravamiento del daño tisular (Figura 3).

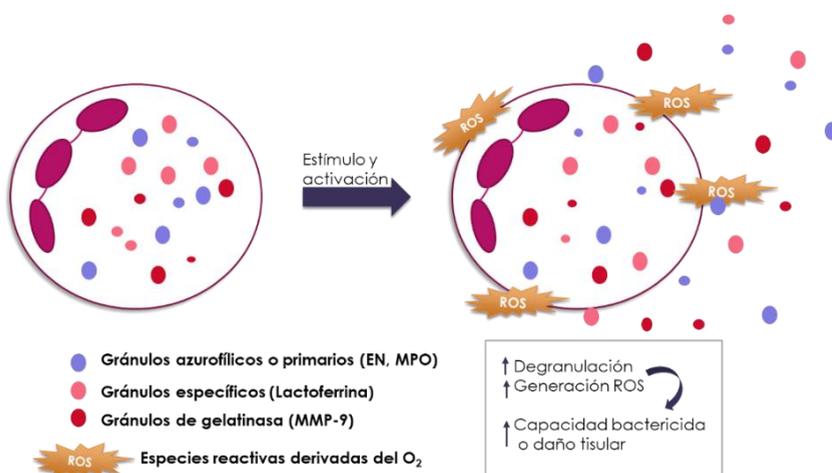


Figura 3. Esquema estado inactivado-activado del neutrófilo. Elaboración propia.

INTRODUCCIÓN

Como vemos existen diferentes ligandos cada uno de los cuales pueden desencadenar diferentes efectos sobre la degranulación o el estallido oxidativo. En el presente estudio nos centraremos en el TNF- α y N-formilmetionina-leucil-fenilalanina (fMLP), ya que han sido ampliamente utilizados por diversos autores como estímulo previo de los neutrófilos (57,58). El péptido formilado bacteriano fMLP, puede simular el *priming* de los neutrófilos *in vitro*, ya que es capaz de generar altos niveles de IL-8. Por otro lado, la valoración del TNF- α como agente inductor de *priming* es de especial relevancia en el DAAT ya que, tanto en estos pacientes como en otras enfermedad inflamatorias, la liberación de esta citoquina proinflamatoria se encuentra incrementada (59). Ambos inductores tienen efectos diferentes: el fMLP desencadena rápidamente la liberación de las vesículas secretorias, el TNF- α ha demostrado intervenir en la liberación de los gránulos primarios (60). Se ha confirmado que la presencia de TNF- α parece ser suficiente para movilizar los gránulos secundarios y terciarios (60), mientras que para promover la liberación de los gránulos primarios es necesario adicionar un segundo estímulo con fMLP.

1.2.2.3. Capacidad bactericida

Una vez los neutrófilos han alcanzado el foco de infección, ponen en marcha estrategias para la destrucción del patógeno. Estas células poseen dos tipos de armas contra las infecciones: a nivel intracelular a través de sus gránulos y producción de especies

INTRODUCCIÓN

reactivas, y a nivel extracelular, mediante los NETs (*Neutrophil extracellular traps*).

La fagocitosis es el principal mecanismo para la captación y eliminación del patógeno, permitiendo la ingestión de una partícula opsonizada en 20 segundos (61). En primer lugar, el neutrófilo capta y rodea al agente patógeno en una vesícula, denominada “fagosoma”. Una vez el fagosoma se ha formado, madura fusionándose con una variedad de vesículas presentes en el citosol del neutrófilo (gránulos azurófilos y específicos) vertiendo las moléculas citotóxicas almacenadas y convirtiéndose en un “fagolisosoma”. En esta vacuola, además de la digestión del patógeno, se produce el ensamblaje de las subunidades de la NADPH oxidasa (NOX) en la membrana fagolisosomal y, por tanto, la producción de especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS, del inglés “*reactive oxygen species*”), creando un ambiente óptimo para activar a las proteasas y a la vez tóxico, para la mayoría de patógenos (62).

En el ciclo de cloración, la MPO liberada de los gránulos primarios, transforma el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en ácido hipocloroso (HOCl) o, en el ciclo de peroxidación, utiliza esta especie para oxidar otros sustratos (63). Por otro lado, las membranas de los gránulos son capaces de fusionarse con la membrana citoplasmática, soltando el contenido de sus gránulos al medio extracelular, lo que se conoce como degranulación. Cuando ocurre este fenómeno se libera una gran variedad de proteasas, especialmente las contenidas en los gránulos azurófilo y específicos como defensinas, lisozima,

INTRODUCCIÓN

lactoferrina, EN o MPO (64). Las metaloproteasas incluidas en los gránulos gelatinasa se liberan igualmente al medio extracelular.

El sistema NOX puede ensamblarse también en la membrana celular del neutrófilo, produciendo y descargando especies reactivas al medio extracelular (65), lo que se conoce como estallido oxidativo.

El tercer mecanismo se conoce como NETosis y consiste en la liberación de las trampas extracelulares, compuestas por las proteínas procedentes de los gránulos y por la cromatina, que puede provenir del ADN del núcleo (66) (lo que conlleva la muerte celular), o de las mitocondrias (67).

1.2.3. Gránulos de los neutrófilos

La composición de los diferentes gránulos es distinta según el momento en el que se han formado durante la granulopoyesis; es decir, la regulación de la síntesis de las proteínas de los gránulos está relacionada por el proceso de diferenciación neutrofílica y depende de las concentraciones de los factores de transcripción y de los factores de crecimiento (68). Los gránulos no solo se diferencian por su contenido en proteínas, sino también por el momento en que se liberan. Las primeras vesículas en liberarse son las vesículas secretorias que son cruciales en las etapas tempranas de la respuesta neutrofílica. Los siguientes en ser movilizados hacia la superficie celular son, respectivamente, los gránulos terciarios, secundarios y primarios.

INTRODUCCIÓN

a) Vesículas secretorias

Estas vesículas, a pesar de ser las últimas en formarse durante la maduración de los neutrófilos, son las que se liberan con mayor facilidad tras la exposición a agentes de *priming*. Presentan una gran variedad de receptores asociados a la membrana como las integrinas (CD11b/CD18) y los receptores de fMLP, lo que facilita el reclutamiento de estas células en el foco de la infección durante las fases tempranas de la respuesta inflamatoria. Los componentes intravesiculares de las vesículas secretorias son escasos, en su mayoría proteínas plasmáticas, lo que sugiere que se forman por endocitosis a diferencia del resto de gránulos (69).

b) Gránulos terciarios o de gelatinasa

Estos gránulos son los siguientes en ser estimulados tras las vesículas secretorias. Contienen receptores de membrana, como CD11b/CD18, necesarios en la extravasación y migración de los neutrófilos hacia los tejidos, y también, enzimas degradadoras de la matriz como las gelatinasas, siendo la gelatinasa B o metaloproteasa-9 de matriz (MMP-9), su componente mayoritario. Las MMPs son un conjunto de enzimas capaces de degradar diferentes componentes de la matriz extracelular por ello, la proteína MMP-9 es fundamental para la extravasación y migración de los neutrófilos. Sin embargo, esta misma característica le confiere cierta capacidad para provocar daño tisular. Por ello, estas enzimas son almacenadas en sus formas inactivas hasta que son liberadas (70–72). Por otro lado, esta familia de proteínas participa en la liberación de TNF- α y otras citoquinas

INTRODUCCIÓN

proinflamatorias. También han sido relacionadas con ciertas patologías, por ejemplo, se han observado niveles incrementados de MMP-9 en pacientes con enfisema pulmonar.

Los gránulos de gelatinasa también contienen en su membrana el citocromo b558, componente de la NOX, por lo que resulta indispensable para la acidificación y producción de ROS en el fagosoma.

c) Gránulos secundarios o específicos

Estos gránulos tienen un papel antimicrobiano fundamental. Su componente más importante es la lactoferrina, una proteína de la familia de las transferrinas que, durante los procesos inflamatorios, es liberada al plasma donde es capaz de secuestrar iones de hierro, que son vitales para el crecimiento bacteriano (73). Además, puede unirse a la membrana bacteriana produciendo lisis celular (74). La lactoferrina no solo tiene una capacidad antimicrobiana sino que también se la ha relacionado con funciones inmunomoduladoras, antioxidantes y antiinflamatorias (75). Estos gránulos contienen además otros componentes antimicrobianos como el hCAP-18.

d) Gránulos primarios o azurófilos

Estos son los últimos gránulos en ser liberados desde los neutrófilos al exterior; de esta forma se reduce la probabilidad de que la batería de serín-proteasas potencialmente destructiva, contenida en ellos, pase al espacio extracelular. Para inducir esta degranulación

INTRODUCCIÓN

al medio extracelular se requieren estímulos muy potentes siendo lo más común que se fusionen con el fagosoma (76).

El marcador más importante de estos gránulos es la MPO. Esta enzima, muestra, por un lado, capacidad antimicrobiana ya que reacciona con el H_2O_2 producido durante el estallido oxidativo del neutrófilo, dando lugar a diferentes productos con gran potencial antimicrobiano que pueden atacar la superficie microbiana, entre ellos el HClO (77). Por otro lado, la MPO también es capaz de modular la respuesta inmune. Se ha observado que aumenta la vida media de los neutrófilos retrasando la apoptosis y manteniendo así el proceso inflamatorio (78). Así mismo se la ha relacionado con el daño oxidativo detectado en diversas enfermedades, incluida la EPOC no asociada al DAAT.

Los gránulos primarios también contienen otras serín-proteasas como la EN, la catepsina G y la PR3, fundamentales en la destrucción del patógeno. El sistema NOX crea, en el fagolisosoma, el ambiente idóneo para el funcionamiento de las proteasas (61). La EN es una de las enzimas predominantes en estos gránulos y, al ser liberada al medio extracelular, desempeña su papel antimicrobiano ya que es capaz de degradar el colágeno, la elastina o la membrana basal.

Se ha observado que algunas serín-proteasas, especialmente la EN, poseen una capacidad reguladora de la inflamación. Son capaces de transformar los precursores inactivos en citoquinas activas, inactivar las citoquinas por proteólisis o provocar la proteólisis de la unión citoquina- receptor de membrana. Además, se ha observado en

INTRODUCCIÓN

ratones, que la EN es capaz de modular la expresión y actividad de diversas citoquinas proinflamatorias como el TNF- α . En un modelo animal, se ha demostrado, que en ausencia de EN, disminuye la producción de TNF- α , proteína inflamatoria de macrófago 2 (MIP-2) y IL-6 en los pulmones, decayendo de esta forma la protección contra infecciones (79). Se ha demostrado *in vitro* que tanto la EN como la PR3 son capaces de escindir el receptor endotelial PAR-1 (receptor-1 activado por la proteasa) reduciendo la integridad de la barrera endotelial y promoviendo así, la infiltración neutrofílica (80).

Cabe destacar que, aunque anteriormente se pensaba que la proteína AAT, clave en nuestro estudio, se encontraba solo en estos gránulos primarios, Clemmensen *et al.* (81) demostraron que también se expresa y puede ser liberada por los tres tipos de gránulos.

1.2.4. Estrés oxidativo

Tradicionalmente se ha definido el estrés oxidativo como un desequilibrio entre las sustancias prooxidantes y antioxidantes. A nivel celular, dentro de las especies oxidantes, podemos diferenciar dos grupos. Por un lado, se encuentran las ROS, entre las cuales se incluyen el O_2^- , H_2O_2 o el ion hipoclorito (OCl^-). Por otro lado, están las especies reactivas derivadas del nitrógeno (RNS, del inglés "*reactive nitrogen species*") entre las cuales destacan el NO y los peroxinitritos ($ONOO^-$). En condiciones fisiológicas, las ROS y RNS cumplen funciones esenciales, como sustancias antimicrobianas y como moduladores de la respuesta inmune. Reúnen características ideales para cumplir esta

INTRODUCCIÓN

función, por una parte son moléculas pequeñas que pueden difundir fácilmente a través de las membranas celulares y por otro lado, son rápidamente degradadas por los sistemas antioxidantes (82). También están implicadas en procesos como la quimiotaxis, la adhesión, el *rolling* y la fagocitosis de los neutrófilos, la formación de las NETS y en las rutas de señalización intracelulares (83). Debido a que las ROS difunden fácilmente al medio extracelular aun siendo producidas en el interior de la célula, cuando se produce la migración de los neutrófilos a los tejidos, las ROS pueden inducir la expresión de GMP140 y regular la expresión de moléculas de adhesión celular (CAMs) en la superficie de las células endoteliales (84), necesarios para la extravasación. El factor de transcripción NF- κ B regula la expresión de numerosos genes implicados en regulación del ciclo celular, en la inflamación o en la respuesta inmune (85). A su vez este factor de transcripción esta modulado por las ROS, y su regulación varía según el compartimento celular, mientras que en el citoplasma las ROS activan dicha vía, en el núcleo la inhiben (86).

Los neutrófilos activados, entre otros tipos celulares, mediante el estallido oxidativo producen y liberan especies reactivas como mecanismo de defensa frente a los patógenos (83) (Figura 3). La enzima de mayor importancia en este proceso es la NOX. De hecho, se ha observado que pacientes con mutaciones en los genes que codifican para la NOX presentan infecciones recurrentes. Esta enzima está constituida por 6 subunidades que, en condiciones fisiológicas, para evitar el daño oxidativo, se encuentran separadas. Una vez activado el neutrófilo se produce el ensamblaje del complejo

INTRODUCCIÓN

enzimático (87), que es capaz de elaborar O_2^- mediante la transferencia de electrones del NADPH al O_2 .

A partir de la generación del anión O_2^- se crean otras especies reactivas implicadas en el estallido oxidativo. De esta forma, el O_2^- puede ser dismutado, bien por la superóxido dismutasa (SOD) o espontáneamente a H_2O_2 . A partir del H_2O_2 se puede generar el radical hidroxilo ($OH\bullet$) por la reacción de Fenton en presencia de ion ferroso (88).

Como ya hemos visto, tras la activación de los neutrófilos, estas células secretan los gránulos primarios liberando MPO al fagosoma que da lugar a HClO, que puede reaccionar con aminoácidos generando cloraminas. También el HClO puede reaccionar con O_2^- dando lugar al radical hidroxilo ($OH\bullet$) (89) o con H_2O_2 , generando el oxígeno singlete.

Además de las ROS también se pueden producir RNS. Entre ellos, el NO tiene especial importancia en el proceso inflamatorio al aumentar la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). El NO es capaz de difundir fácilmente a través de las membranas celulares y al combinarse con el O_2^- , dar lugar a $ONOO^-$ con lo que se incrementan sus propiedades antimicrobianas ya que esta molécula presenta mayor potencial citotóxico y es un potente proinflamatorio (90). El NO también puede dar lugar a otras RNS, como el dióxido de nitrógeno o el trióxido de dinitrógeno con capacidad oxidativa.

Sin embargo, la presencia excesiva de estas especies puede tener efectos perjudiciales graves para las células y los tejidos

INTRODUCCIÓN

expuestos a ellas. Tanto las ROS como los RNS son potentes oxidantes que pueden producir daño oxidativo reaccionando rápidamente con las biomoléculas incluyendo DNA, proteínas y lípidos. A esto se suma la alteración de las rutas de señalización reguladas por dichas especies. En consecuencia, se ha observado su implicación en gran variedad de enfermedades respiratorias como el DAAT, la fibrosis quística y la fibrosis pulmonar idiopática, entre otras (91). Por esta razón, existen ciertos sistemas antioxidantes dentro de la célula para evitar la acumulación de las especies prooxidantes y mantener el equilibrio REDOX necesario para la homeostasis celular. Cabe destacar que, además de estrés oxidativo también se puede producir un estrés reductivo acompañado de efectos patológicos. Por este motivo, se ha propuesto una nueva definición de estrés oxidativo como una disrupción de la señalización redox fisiológica (92,93).

El sistema antioxidante cuenta con una serie de moléculas de bajo peso molecular, entre las cuales destaca el glutatión reducido (GSH), que pueden oxidarse directamente protegiendo a las biomoléculas. Por otro lado, existe un complejo y eficaz sistema antioxidante enzimático constituido por distintas enzimas: SOD que es capaz de dismutar el anión O_2^- a H_2O_2 ; la CAT que cataliza la descomposición del H_2O_2 ; la glutatión peroxidasa (GPX) que puede reducir el H_2O_2 y otros hidroperóxidos, y la glutatión reductasa (GR) que reduce el glutatión oxidado (GSSG) a GSH (91) (Figura 4). Dentro del sistema antioxidante celular, cabe destacar el factor nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2). Este sistema se regula por su interacción con la proteína Keap1, y bajo condiciones normales este factor de

INTRODUCCIÓN

transcripción queda secuestrado por su unión con el Keap1 mientras que, bajo condiciones de estrés oxidativo, el Nrf2 queda liberado y se transloca al núcleo celular donde cumplirá su función uniéndose a las secuencias ARE (elementos de respuesta antioxidante) (94). El Nrf2 afecta a casi 500 genes que codifican proteínas implicadas en el equilibrio redox entre otras funciones (95,96).

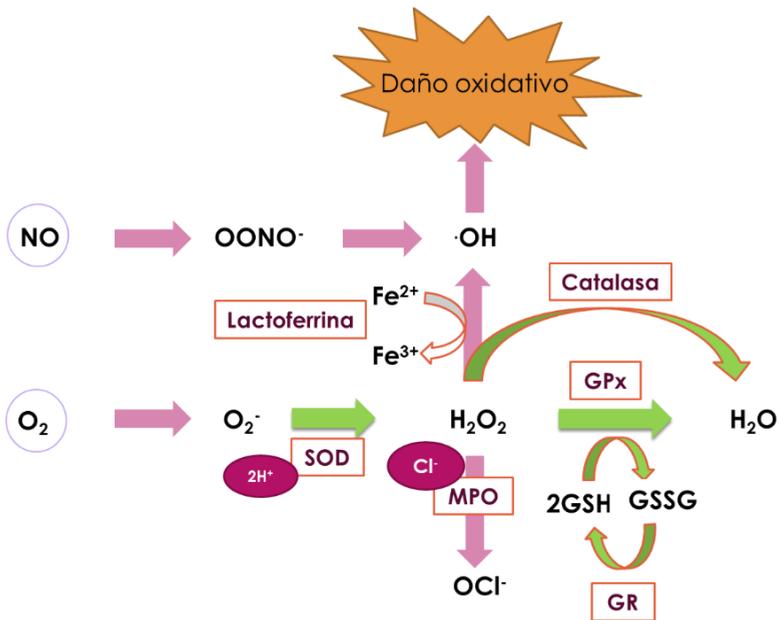


Figura 4. Principales ROS y mecanismos antioxidantes celulares. Elaboración propia.

1.3. Papel de los neutrófilos en el DAAT

Tradicionalmente se ha considerado al DAAT como una condición asociada al desequilibrio proteasa-antiproteasa en el pulmón, sin embargo, cada vez se reconoce más como un desorden inflamatorio en el que los neutrófilos juegan una función clave. El primer indicio del papel fundamental que desempeñan los neutrófilos en la enfermedad, es el aumento de la carga de estas células en los pulmones de los pacientes, lo que desencadena una gran actividad proteolítica y agrava el proceso inflamatorio (97).

Aunque la acumulación de neutrófilos en las vías respiratorias forma parte de la respuesta defensiva normal del hospedador contra una infección, cuando ésta es excesiva o incontrolada puede provocar un daño progresivo en el epitelio bronquial. Se ha observado un aumento, de al menos 3 veces, en el número de neutrófilos del líquido de lavado broncoalveolar, en los pacientes con DAAT ZZ y enfisema, respecto a individuos sanos MM (98). Asimismo, se ha demostrado que sujetos MZ asintomáticos también presentan mayor cantidad de neutrófilos en el esputo que individuos sanos MM, aunque en cantidades similares a los que presentaban una EPOC estable, lo que podría sugerir que los MZ tienen mayor riesgo de desarrollar cambios pulmonares (99).

Existen diferentes propuestas sobre las causas de este aumento en el número de neutrófilos. Alan T Mulgrew *et al.* sugieren que los polímeros Z AAT, acumulados en las CEA o células epiteliales

INTRODUCCIÓN

bronquiales (CEB), actúan como un potente quimioatrayente de los neutrófilos, similar a la IL-8 *in vitro* (100). Al mismo tiempo, la EN puede inducir la expresión de la IL-8 (101) en las CEB, a través del *Toll-like* receptor 4, lo que conlleva la quimiotaxis de los neutrófilos y un aumento de la carga inflamatoria en el pulmón. Otra de las propuestas considera la capacidad de la AAT para regular la quimiotaxis de neutrófilos. Por un lado, como se ha comentado anteriormente, se ha observado que la AAT glicosilada se une a la IL-8 formando el complejo AAT-IL-8 evitando de esta forma la interacción entre la IL-8 y su ligando receptor de quimioquina con motivo C-X-C (CXCR1) y disminuyendo la quimiotaxis de los neutrófilos en respuesta a la IL-8 (14). Por otro lado, se ha observado que la AAT afecta a la migración de los neutrófilos mediada por siC. La AAT inhibe la actividad proteínasa de la ADAM17 evitando la liberación de CD16b de la membrana celular, necesaria para la respuesta quimiotáctica de estas células. Además, se ha visto que los neutrófilos aislados de pacientes con DAAT ZZ, presentan una menor expresión de CD16b en su membrana y un aumento de la quimiotaxis, en respuesta a la IL-8 y siC, frente a los individuos MM, lo cual puede ser revertido con la terapia de reposición (14). Por último, el leucotrieno B4 (LTB4), liberado de los macrófagos alveolares, también puede intervenir en el aumento de la neutrofilia en el DAAT. Se ha demostrado que la EN induce la producción y liberación de LTB4, considerado un potente quimioatrayente de neutrófilos y que los niveles plasmáticos de LTB4 en los individuos ZZ están aumentados en comparación con los de los individuos sanos. La terapia de reposición en estos pacientes ZZ disminuye los niveles de LTB4 plasmáticos (102).

INTRODUCCIÓN

1.3.1. Acción a nivel pulmonar de los neutrófilos en el DAAT

El aumento de los neutrófilos observado en los pacientes con DAAT se correlaciona con altos niveles de proteasas y citoquinas proinflamatorias en el pulmón y con la disminución de la función pulmonar. Esta disminución es más rápida en los individuos con DAAT que en la población general, incluso superior a la de los pacientes con EPOC no asociada al DAAT (103).

1.3.1.1. Equilibrio proteasa-antiproteasa

Se han descrito distintos factores que intervienen en el desequilibrio proteasa-antiproteasa en el pulmón.

La EN, como se ha comentado anteriormente, es considerada la proteasa más importante en cuanto a su actividad proteolítica en el pulmón. Se han observado niveles elevados de la EN en pacientes con DAAT (103), lo que concuerda con el aumento del número de neutrófilos (recordemos que la EN puede inducir la quimiotaxis de neutrófilos) y la disminución de la función pulmonar. Aunque otras proteasas liberadas por los neutrófilos, como la catepsina G y la PR3, también podrían ser importantes, su papel en el DAAT todavía no se conoce con claridad.

Adicionalmente, varios estudios han demostrado que el tabaco promueve el desequilibrio proteasa-antiproteasa en el pulmón, lo cual se correlaciona, de nuevo, con la disminución de la función

INTRODUCCIÓN

pulmonar en fumadores. En 1979 JE Gadek *et al.* relacionaron la exposición al humo del tabaco con la disminución de actividad antielastasa de la AAT en el tracto respiratorio inferior (104). Otro estudio llevado a cabo con muestras de lavado broncoalvelolar (BAL) determinó que, debido a la oxidación de los residuos de metionina de la AAT, los individuos MM fumadores presentan un 40% menos de actividad antielastasa que los individuos MM no fumadores (105). Posteriormente, se demostró que la disminución de la actividad antielastasa está producida por la oxidación de los residuos de metionina 351 y 358 de la AAT (106).

Asimismo, el plasma de individuos ZZ comparados con los MM también presenta menor actividad para inhibir la EN. Como ya se ha mencionado, F Ogushi *et al.* , además de demostrar una capacidad inhibitoria significativamente menor en los individuos ZZ, observaron que los complejos Z-AAT-EN eran menos estables que los MM-AAT-EN. Por lo tanto, los individuos ZZ no solo presentan niveles menores de AAT sino que, además, son menos funcionales (38).

Respecto a los efectos del *priming* sobre la degranulación, se ha observado que los neutrófilos aislados de pacientes con DAAT y afectación pulmonar, liberan mayores niveles de MPO y EN (gránulos primarios) estimulados con TNF- α y fMLP respecto a los individuos sanos (58). La adición de AAT exógena puede modular la degranulación inducida por el TNF- α /fMLP de los neutrófilos. El incremento de la liberación de MPO por los neutrófilos activados, tanto de voluntarios sanos como de pacientes con DAAT, se ve reducido en presencia de AAT exógena (58).

INTRODUCCIÓN

Estudios previos con neutrófilos aislados de voluntarios sanos estimulados con TNF- α (60) determinaron, que para que se produzca un aumento en la producción intracelular de ROS, así como la movilización y liberación de sus gránulos primarios, debe sumarse la activación con fMLP. Además, la liberación de EN se incrementa en ausencia de ROS derivadas del estallido oxidativo (60).

1.3.1.2. Inflamación

La EN, asocia a su capacidad proteolítica, a la de inducir la expresión de citoquinas proinflamatorias, como la IL-8 y la IL-1, en las CEB, contribuyendo de esta forma a la quimiotaxis de neutrófilos y agravando el proceso inflamatorio en el pulmón (107,108). Se han observado niveles elevados de las citoquinas proinflamatorias, IL-8, IL-6 e IL-1 β en el líquido de revestimiento epitelial pulmonar (ELF) de pacientes con DAAT y deterioro funcional pulmonar leve respecto a individuos sanos (103).

Al mismo tiempo, los neutrófilos aislados de pacientes ZZ y cultivados durante 6 horas, mostraron en el sobrenadante 4 veces más TNF- α que los neutrófilos procedentes de individuos MM, a pesar de no encontrar en ellos diferencias significativas en los niveles plasmáticos (59). Además, de demostrar que los pacientes con DAAT presentan un aumento del sistema TNF- α , lo que evidencia el carácter proinflamatorio de esta condición, se ha comprobado que la terapia de reposición, de acuerdo con las propiedades antiinflamatorias de la

INTRODUCCIÓN

AAT, puede reducir la expresión de dicha citoquina proinflamatoria (59).

1.3.1.3. Estrés oxidativo

Como hemos dicho anteriormente, los neutrófilos en condiciones normales producen ROS a través de la NOX, para destruir bacterias y hongos en las vacuolas fagocíticas, sin embargo, una excesiva e incontrolada liberación de ROS al medio extracelular produce daño en el parénquima pulmonar.

Se ha demostrado que la AAT puede modular los niveles de ROS liberados por los neutrófilos, actuando como ROS *scavenger* directo, ya que como se ha explicado anteriormente la AAT es susceptible de oxidación en sus residuos de metionina (22), o mediante la inhibición de proteasas unidas a la membrana involucradas en el estallido oxidativo, concretamente en la producción de anión O_2^- (20).

Los neutrófilos activados (utilizando TNF- α junto a fMLP) aislados de pacientes DAAT con enfermedad de las vías respiratorias (FEV1<80%) presentan un incremento en la producción de O_2^- respecto a las células procedentes de voluntarios sanos (58). Este incremento en la producción de ROS puede ser inhibido por adición de AAT exógena (58).

INTRODUCCIÓN

1.3.1.4. Capacidad para eliminar bacterias

A pesar del incremento del número de neutrófilos en el pulmón, en los pacientes con DAAT, esto no se traduce en un aumento de la capacidad para proteger los pulmones frente a las bacterias. Se ha observado que los neutrófilos en el DAAT presentan menor capacidad para destruir bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* (109). Por otro lado, la ZZ-AAT mal plegada, es disfuncional, y por ganancia de función se acumula en el RE de los neutrófilos, provocando estrés en el RE y consecuentemente un aumento de la apoptosis de estas células (señales apoptóticas incluyendo las vías del TNF- α) y una menor capacidad antibacteriana lo que podría derivar en una mayor susceptibilidad a la infección; es decir, la AAT podría regular la apoptosis neutrofílica (109), que se puede modificar con la terapia de reposición, la cual, disminuye la actividad ADAM17 del neutrófilo y la apoptosis, mientras aumenta la capacidad antibacteriana. La AAT presenta propiedades anti-apoptóticas (se ha observado que previene la apoptosis en células alveolares (110) o células beta pancreáticas (111)) y prolonga, de esta manera, la vida media de los neutrófilos, así como su capacidad antibacteriana, a la vez que contribuye a una disminución de la inflamación neutrofílica.

INTRODUCCIÓN

1.3.1.5. Efecto a nivel sistémico de los neutrófilos en el DAAT

La respuesta anómala de los neutrófilos DAAT podría deberse tanto a la ganancia de función (estrés del RE que conlleva a apoptosis), como a la falta de actividad para inhibir las proteasas/inflamación sistémica. Esto no solo afectaría al pulmón, como hemos descrito anteriormente, sino que se expandiría a nivel sistémico. Uno de los mediadores o moduladores de la inflamación, tanto a nivel local como sistémico es el TNF- α . Esta citoquina proinflamatoria regula su propia expresión génica (112) al mismo tiempo que modula la expresión de otras citoquinas inflamatorias, como la IL-8 (113). A su vez la AAT es capaz de modular la expresión y por tanto la actividad del TNF- α , mediante la modulación de la interacción ligando-receptor entre TNF- α y su receptor; inhibe la señalización NF- κ B (ruta de señalización intracelular TNF- α) regulando, en consecuencia, la degranulación de los gránulos terciarios y secundarios neutrofílicos (59). Por último, en pacientes con DAAT ZZ, estos mecanismos están reducidos significativamente, como se ha demostrado al encontrar niveles plasmáticos incrementados de autoanticuerpos contra la lactoferrina en plasma de individuos con DAAT ZZ, lo que conlleva un aumento de los niveles de las ROS producidos por los neutrófilos. Además, en individuos ZZ con terapia de reposición, la AAT exógena también inhibe la ruta de señalización del TNF- α .

1.4. Papel del estrés oxidativo en el DAAT

1.4.1. Estrés oxidativo a nivel hepático

A nivel hepático, existen varios estudios en modelos animales que relacionan el DAAT con el estrés oxidativo. Se observó, que los ratones transgénicos PiZ presentaban niveles aumentados de enzimas antioxidantes, como la tioredoxina y, en lo referente al perfil oxidativo, mostraban un aumento de la relación GSH/GSSG (cambio reductivo) y una mayor cantidad de GSH y proteínas reducidas en el RE. Sin embargo, en el citoplasma de estos ratones no se encontraron diferencias significativas en la concentración de tioles proteicos con respecto a los ratones control (114). Otro estudio llevado a cabo en un modelo murino de DAAT, estableció que los ratones Z-AAT presentaban un aumento de los biomarcadores de daño oxidativo en las biomoléculas (niveles de malondialdehído (MDA), 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG), proteínas carboniladas incrementados). Este estudio también parece indicar que el estrés oxidativo es un factor clave en el desarrollo de enfermedad hepática en el DAAT, ya que permitió observar la presencia de niveles incrementados de ROS y una menor expresión de enzimas antioxidantes y un mayor daño celular en el tejido hepático de los ratones PiZ viejos, respecto al de los ratones más jóvenes (115).

INTRODUCCIÓN

1.4.2. Estrés oxidativo a nivel sistémico

A nivel sistémico, en individuos con DAAT y ya en etapas tempranas se observa un aumento del estrés oxidativo. Se ha constatado que niños asintomáticos con DAAT (MZ; SZ; ZZ) presentan niveles plasmáticos significativamente disminuidos de GSH y de actividad CAT junto a un incremento del cociente GSSG/GSH y de la actividad glutatión peroxidasa, lo que se traduce en el aumento observado en el H_2O_2 . Además, se determinó un mayor daño oxidativo en las biomoléculas. Por otro lado, en los individuos MS y SS (con bajo riesgo fenotípico de desarrollar enfermedad pulmonar o hepática) no se encontraron diferencias significativas respecto al grupo control (116). Otro estudio muestra que dos pacientes con enfisema severo presentaban niveles muy altos del marcador 8-OHdG en orina (117). Por otro lado, se ha determinado que niños con DAAT (MZ; SZ; ZZ) sin enfermedad hepática, ni pulmonar, mostraban, además de un mayor estrés oxidativo plasmático, un acortamiento telomérico en las células mononucleares circulantes, lo que sugiere una posible relación entre el acortamiento de los telómeros y el estrés oxidativo en los pacientes con DAAT (118).

1.5. Hipoxia

1.5.1. Requerimientos de oxígeno

El oxígeno (O_2) es una molécula fundamental para la producción de energía. Es utilizado en la ruta metabólica de la fosforilación oxidativa para dar lugar a adenosina trifosfato (ATP) a través de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. Sin embargo, los neutrófilos no tienen muchas mitocondrias y debido a la necesidad de funcionar a bajas concentraciones de O_2 , se han adaptado para trabajar generalmente (aunque no exclusivamente) utilizando el metabolismo anaeróbico a través de la glucólisis, a pesar de que este proceso es mucho menos eficiente que la fosforilación oxidativa, en la producción de ATP (2 vs 26-30 moléculas de ATP).

1.5.2. Hipoxia fisiológica o patológica

Bajo condiciones fisiológicas, en el organismo existe un amplio rango de tensiones de O_2 , que varían desde 13 kPa en la sangre arterial a 2,3 kPa en el bazo (119). Incluso en un mismo órgano podemos encontrar diferentes tensiones de O_2 , por ejemplo, en el hígado (de 0.13 kPa en el sinusoides a 8 kPa en las regiones portales) (120,121).

Por otro lado, los leucocitos, entre los que se incluyen los neutrófilos, desde que se generan en la médula ósea y durante su camino en la circulación están expuestos a tensiones de O_2 diferentes desde 13 kPa en los capilares alveolares a unos 5 kPa en la sangre venosa (122) y van pasando por diversos territorios exponiéndose a

INTRODUCCIÓN

diversas tensiones de O_2 , y sometiéndose a situaciones que algunos autores definen como de “hipoxia intermitente”. Sin embargo, estas tensiones de O_2 , aunque extremadamente bajas, constituyen el estado fisiológico normal de los neutrófilos, por lo que no se puede argüir que se encuentren en una situación de hipoxia, la cual se define como una situación en la que existe un suministro insuficiente de O_2 en relación con la demanda.

Cuando hablamos de hipoxia *in vivo*, podemos diferenciar entre hipoxia fisiológica, cuando existe un suministro inadecuado de O_2 al organismo en su conjunto (por ejemplo, cuando nos encontramos a gran altura) y la hipoxia patológica que puede ser causada por un flujo sanguíneo deficiente que interrumpe el suministro de O_2 y/o por la presencia de células inflamatorias en momentos de infección o daño tisular, que crean una situación en la que la demanda excede al suministro de O_2 . La hipoxia tisular o sistémica patológica es una característica de muchos procesos mórbidos y puede tener tanto efectos positivos como negativos. La hipoxia juega un papel importante en muchas enfermedades respiratorias entre ellas la fibrosis quística (123).

Cuando hablamos de hipoxia *in vitro*, hacemos referencia a la hipoxia experimental que suele indicar el uso de niveles de O_2 de aproximadamente 1% (± 3 kPa) para el cultivo celular (57,124) y alrededor del 15% de O_2 en caso de voluntarios humanos (125). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, hay que recordar que estas tensiones de O_2 son las que tanto las células del sistema inmunológico como los neutrófilos encuentran en situaciones

INTRODUCCIÓN

fisiológicas. Por otro lado, a lo largo del estudio nos referiremos a las condiciones con niveles de O₂ del 21%, como normoxia, ya que ésta es la concentración del O₂ en el aire atmosférico a nivel del mar, razón por la que son utilizadas habitualmente en la experimentación con cultivos celulares.

1.5.3. Mecanismos de respuesta a la hipoxia: HIF

El O₂ es de vital importancia para la función celular, por lo que el organismo desarrolla determinados mecanismos para monitorizar las tensiones de O₂ y responder de forma adecuada tanto a nivel sistémico como celular. La hipoxemia estimula la ventilación actuando a través de los quimiorreceptores periféricos situados en los cuerpos carotídeos y aórticos, los cuales son capaces de detectar cambios en las tensiones parciales de O₂ en sangre. Cuando se dan tensiones arteriales bajas de O₂, se produce una entrada de calcio (Ca²⁺) a la célula del cuerpo carotideo que ocasiona finalmente la liberación de algunos transmisores como las catecolaminas, capaces de iniciar procesos para restaurar la oxigenación de los órganos vitales (126).

Por otro lado, a nivel celular la señalización a través del factor inducible por la hipoxia (HIF) es la encargada de detectar la tensión de O₂ y adaptarse a sus mismos. HIF es un factor de transcripción constituido por una subunidad alfa y otra beta. Se han identificado tres subunidades alfa (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) siendo HIF-1 α la subunidad predominante en los neutrófilos (127) y tres subunidades beta (HIF-1 β , HIF-2 β , and HIF-3 β) siendo la expresión de las subunidades alfa

INTRODUCCIÓN

dependiente de oxígeno mientras que la expresión de las subunidades beta es constitutiva. Por lo tanto, HIF-1 α es uno de los principales reguladores de la homeostasis del O₂ y es el que regula la concentración de O₂ celular (126). Además de mejorar la adaptación celular a las condiciones de hipoxia, HIF también participa en la regulación de la función de células del sistema inmune (128). Concretamente, en los neutrófilos se ha demostrado utilizando un modelo de ratón que HIF-1 α participa en la formación de las NETs así como en la supervivencia celular (129,130). La apoptosis es uno de los principales mecanismos para resolver los procesos inflamatorios, por lo tanto, si las condiciones de hipoxia inhiben la apoptosis se incrementa el daño potencial en el tejido afectado.

1.5.4. Neutrófilos bajo condiciones de hipoxia

1.5.4.1. Hipoxia, inflamación y neutrófilos

Existen numerosos estudios que relacionan la hipoxia y la inflamación, y como ya sabemos, los neutrófilos son esenciales en el proceso inflamatorio.

A nivel sistémico se ha observado que las situaciones de hipoxia pueden inducir la liberación de citoquinas proinflamatorias. En ratones sometidos a condiciones de hipoxia (5% de O₂, durante 60 minutos) se ha visto que se incrementa la liberación de las citoquinas proinflamatorias TNF- α (en todo el tiempo de estudio) e IL-6 (a las 24 horas) en plasma; también aumenta la liberación de TNF- α , IL-1 β e IL-6 por los macrófagos peritoneales y células Kupffer (131). Otro estudio

INTRODUCCIÓN

realizado en individuos sanos -tras 3 o 4 días en condiciones hipóxicas, en estancias a gran altitud-, demuestra niveles plasmáticos incrementados de IL-6, IL-1Ra y proteína C-reactiva (PCR) (la elevación de la IL-6 e IL-1Ra se retrasaba respecto a la PCR, que aumentaba primero (132). Estos estudios sugieren que las condiciones de hipoxia podrían contribuir al proceso de inflamación sistémica. Ambos se realizaron en ausencia de cualquier lesión tisular que pudiera activar el proceso inflamatorio. Por otro lado, la relación entre hipoxia e inflamación ha sido descrita en numerosas enfermedades respiratorias tales como la EPOC (133) o la fibrosis quística (134).

Las células implicadas en la respuesta inflamatoria, entre las que se incluyen neutrófilos y macrófagos, se encuentran en una situación de hipoxia tisular, lo que anteriormente hemos definido como hipoxia patológica, por lo que presentan ciertos mecanismos moleculares y celulares para adaptarse a estas condiciones de baja tensión de O₂. Por ejemplo, bajo condiciones homeostáticas, los neutrófilos -para evitar su degranulación y el consiguiente daño tisular-, sufren fácilmente apoptosis y tienen una vida media muy corta mientras que, en condiciones de hipoxia (a través de HIF-1 α), estas células prolongan su supervivencia lo que retrasa la resolución de la inflamación (129,135).

Ciertos estudios *in vitro* han tratado de valorar los efectos de la hipoxia en los neutrófilos. En uno de ellos, se aislaron neutrófilos de voluntarios sanos tras ser sometidos a hipoxia aguda (hasta una saturación del 68% O₂), activándolos después con forbol-miristatoacetato (PMA), fMLP o con la combinación de ambos; sin embargo, a

INTRODUCCIÓN

diferencia de los niveles plasmáticos, las citoquinas inflamatorias TNF- α , IL-1 e IL-6 no se vieron modificadas significativamente por la situación de hipoxia, lo que podría deberse a que -en estos casos- hubo reoxigenación de las células (136). Asimismo, la hipoxia tampoco modificó la liberación de IL-8, TNF- α , IL-6, IL-10, y la proteína inflamatoria de macrófago 1- β (MIP-1 β) por parte de los neutrófilos aislados de voluntarios sanos, tras ser incubados en condiciones de hipoxia (3kPa O₂) y estimulados posteriormente (GM-CSF, TNF- α o LPS) respecto a la normoxia (124).

1.5.4.2. Efecto de la hipoxia en la degranulación de los neutrófilos

Se ha demostrado que la hipoxia puede modular la degranulación o secreción proteica en diferentes tipos celulares, incluidas las células del sistema inmune y las células endoteliales (137–139).

Dada la capacidad de la hipoxia para inducir la secreción proteica en las células del sistema inmune y en otras, parece lógico estudiar su efecto en los neutrófilos que son células propensas a la degranulación y que, en situaciones incluso fisiológicas como la inflamación, se mueven en ambientes con bajas tensiones de O₂ o hipóxicas. Existe poca evidencia sobre la relación entre la hipoxia y degranulación en los neutrófilos, sin embargo, la literatura parece indicar que la hipoxia aumentaría la liberación del contenido de los gránulos de los neutrófilos.

INTRODUCCIÓN

En varios estudios *in vitro*, realizados en neutrófilos aislados de voluntarios sanos y activados con diferentes agonistas, se ha tratado de estudiar el efecto de la hipoxia en la degranulación.

Se ha observado que, los neutrófilos aislados de voluntarios sanos tras ser sometidos a hipoxia aguda, aumentan la liberación de EN *ex vivo* (con los 3 activadores PMA, fMLP o PAF+fMLP), aunque hay que tener en cuenta que -en este caso- se había producido una reoxigenación (durante el aislamiento y cultivo habían estado sometidos a tensiones atmosféricas de O₂) tras la hipoxemia (136).

Asimismo, existen varios estudios *in vitro* -realizados en neutrófilos aislados de voluntarios sanos- que, tras ser estimulados con diferentes agonistas (GM-CSF, PAF o citocromo B junto a fMLP, o CoMTB (monocitos infectados con *M. tuberculosis*) e incubados bajo condiciones de hipoxia (0,8-1% O₂ o 3 kPa), sufren un incremento en la liberación de EN, MPO, lactoferrina, MMP-8 y MMP-9, respecto a los cultivados bajo condiciones de normoxia. Sin embargo, esto cuando esos mismos neutrófilos, son estimulados con TNF- α junto a fMLP, por lo que se diría que estos agonistas no parecen promover la degranulación (no se observa mayor liberación de EN) (57,124,140). Estos resultados sugieren que la hipoxia promueve la secreción de gránulos azurófilos, específicos y gelatinosos, aunque la respuesta frente a la hipoxia varía según el entorno o *priming*.

Aun así, todavía no está claro si la degranulación de los neutrófilos está regulada por el HIF-1 α . Por un lado, un estudio determinó que el contenido en proteasa de los neutrófilos *knockout*

INTRODUCCIÓN

para el HIF-1 α , está disminuido en comparación con el de los neutrófilos *wildtype* (141). No obstante, esto podría deberse a diferencias en el desarrollo, ya que los gránulos de los neutrófilos se forman en el ambiente profundamente hipóxico de la médula ósea (habiéndose demostrado que los neutrófilos circulantes maduros no transcriben, ni traducen ARNm para NE u otras proteínas granulares (142), lo que pone en duda el correcto uso de los neutrófilos de ratón sin HIF-1 α para estudiar el papel de este factor de transcripción en la degranulación hipóxica.

1.5.4.3. Efecto de la hipoxia en el estrés oxidativo en los neutrófilos

Existen ciertos estudios sobre estrés oxidativo realizados en los neutrófilos. Por un lado, uno de ellos comprobó que los neutrófilos aislados de voluntarios sanos e incubados en condiciones de hipoxia, tras ser estimulados con GM-CSF en combinación con fMLP, muestran una reducción en la liberación de anión O₂⁻ en hipoxia (124). Estos resultados sugieren que la hipoxia podría inhibir la producción de ROS, de forma independiente a NOX, ya que la expresión de las subunidades que la conforman no se vieron afectadas por la hipoxia, a pesar de afectar al estallido oxidativo (124). Cabe destacar que los niveles de O₂⁻ se restablecen rápidamente tras la reoxigenación. En contraposición, otro estudio observó que la producción de anión O₂⁻ se encuentra aumentada en los neutrófilos extraídos (estimulados con PAF junto a fMLP) de sujetos sanos, tras ser sometidos a hipoxemia (136), quizás debido a la reoxigenación. Estas diferencias podrían

INTRODUCCIÓN

deberse al *priming* realizado. Asimismo, en neutrófilos aislados de voluntarios sanos, que tras ser estimulados (con GM-CSF, PAF o TNF- α junto fMLP) fueron incubados bajo condiciones de hipoxia (1% O₂), se observa un incremento del estallido oxidativo (57).

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Justificación del estudio

El DAAT es considerado un trastorno inflamatorio en el que los neutrófilos juegan un papel clave dentro de la fisiopatología de la enfermedad. En este sentido, se ha demostrado que el número de neutrófilos en los pulmones de los pacientes con DAAT es significativamente mayor que en los de los individuos sanos, lo que podría contribuir a un aumento del daño pulmonar observado en algunos de estos pacientes. La capacidad que tienen los neutrófilos para dañar los tejidos adyacentes está relacionada con su estado de activación. Los neutrófilos son células implicadas en la respuesta inmune innata o inespecífica y son el primer tipo celular en llegar a los lugares de infección e inflamación donde desempeñan un papel crucial en la defensa del huésped frente a los patógenos microbianos. Sin embargo, la activación excesiva o incontrolada de los neutrófilos conduce a la liberación del contenido de sus gránulos, ricos en enzimas proteolíticas, y a la generación de ROS y de RNS, cuya acumulación en el espacio extracelular produce un aumento del daño en los tejidos adyacentes. Por otra parte, la llegada de las células implicadas en la respuesta inflamatoria entre ellas los neutrófilos al foco de inflamación o infección provoca una reducción de los niveles locales de O₂, debido a su consumo junto a la producción de ROS. Por lo cual, los neutrófilos trabajan en una situación de hipoxia tisular. Tomando todo ello en consideración, se plantea la necesidad de evaluar el comportamiento de los neutrófilos de pacientes con DAAT bajo condiciones de hipoxia, dado que es el ambiente en el que ejercen sus funciones, con el fin de conocer su papel dentro de la enfermedad.

2.2. Hipótesis

Según nuestra hipótesis de trabajo, la hipoxia tisular produciría la activación de los neutrófilos, con la consiguiente liberación de su contenido en proteasas al medio ambiente tisular y la producción de ROS y de RNS, lo que provocaría un daño oxidativo en las biomoléculas (DNA, lípidos y proteínas) e incrementaría su capacidad para deteriorar el tejido pulmonar. Por otro lado, la prolongación de la vida media de los neutrófilos causada por la hipoxia, podría aumentar la exposición del tejido pulmonar a los neutrófilos activados, los cuales contribuirían al desarrollo del proceso inflamatorio mediante la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. En los pacientes con DAAT, las proteasas liberadas por los neutrófilos y el incremento de las ROS no podrían ser eliminadas correctamente debido a la existencia de bajos niveles plasmáticos de AAT, situación que sería revertida por la terapia de reposición.

2.3. Objetivos

El **objetivo principal** de este estudio es determinar si la hipoxia induce la activación de los neutrófilos en pacientes con DAAT y si la terapia de reposición reduce dicha activación.

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

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- Evaluar las diferencias existentes entre voluntarios sanos, pacientes con DAAT y pacientes con EPOC no asociada al DAAT en la degranulación, producción de citoquinas proinflamatorias, perfil oxidativo y sistema antioxidante de los neutrófilos bajo condiciones de hipoxia (1% O₂). Evaluar las diferencias entre los distintos fenotipos dentro de los pacientes con DAAT. Hasta este momento, no existen datos que hayan evaluado la consecuencia de los niveles plasmáticos intermedios de AAT (MZ) sobre la fisiología de los neutrófilos, lo que es importante teniendo en cuenta, por un lado, el elevado número de individuos con este fenotipo y, por otro, los resultados de estudios previos, que han puesto de manifiesto que los individuos MZ tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedad pulmonar en comparación con los controles sanos (MM).
- Determinar si existen diferencias entre las condiciones de hipoxia (1% O₂) frente a normoxia (21% O₂) en la degranulación, producción de citoquinas proinflamatorias, perfil oxidativo y sistema antioxidante de los neutrófilos provenientes de voluntarios sanos, pacientes con DAAT y pacientes con EPOC no asociada al DAAT.

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- Evaluar el efecto del tratamiento con terapia de reposición en la degranulación, producción de citoquinas proinflamatorias, perfil oxidativo y sistema antioxidante de los neutrófilos, bajo condiciones de hipoxia (1% O₂), provenientes de voluntarios sanos, pacientes con DAAT y pacientes con EPOC no asociada al DAAT.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Pacientes

3.1.1. Aspectos éticos

Este proyecto de investigación se ha llevado a cabo en la Unidad Central de Investigación Médica (UCIM) de la Fundación para la Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia-IIS INCLIVA (FIHCUV-IIS INCLIVA). Los pacientes y los voluntarios sanos en edad pediátrica fueron reclutados en el Servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario de Valencia por la Dra. Silvia Castillo y en el Servicio de Pediatría del Hospital de Manises (Valencia) por la Dra. Teresa Romero. Los pacientes y los voluntarios sanos en edad adulta fueron reclutados en el Servicio de Neumología del Hospital Clínico Universitario de Valencia por la Dra. Cruz González y en el Servicio de Neumología del Hospital Dr. Peset de Valencia por el Dr. Alberto Herrejón. El proyecto cuenta con la aprobación de los Comités de Ética e Investigación de cada hospital participante (Anexo 1), y se ha ajustado en todo momento a la legislación vigente en cuanto a la confidencialidad de las muestras y al uso de las bases de datos. Los posibles participantes en el estudio fueron informados sobre el proyecto, y sólo se incluyeron aquellos sujetos que, tras dicha información, firmaron el consentimiento informado (Anexo 2); en el caso de los voluntarios menores de edad fueron sus representantes legales los que firmaron el consentimiento. El trabajo se ha regido, en su totalidad, por los Principios Éticos para las Investigaciones Médicas en Seres Humanos de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (143).

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.2. Anamnesis y evaluación general

La información respecto a los sujetos participantes en el estudio incluye los siguientes datos: fecha de nacimiento, edad en el momento de la extracción (años), sexo, peso, talla e índice de masa corporal (IMC), y posibles antecedentes de enfermedades respiratorias, hepáticas o infecciosas.

El estado real del paciente, en el momento de extracción de la muestra, se valoró mediante las siguientes pruebas: Espirometría y RX Tórax/TACAR. Asimismo, se midieron los niveles de vitaminas, transaminasas y AAT en sangre. Todas estas pruebas forman parte de la práctica clínica habitual en el manejo de este tipo de pacientes.

3.1.3. Población de estudio

El estudio se ha realizado, como se ha mencionado previamente, en voluntarios sanos y pacientes, ajustados por edad y fenotipo de AAT, distribuidos según los criterios de elegibilidad descritos a continuación:

Sujetos en EDAD PEDIÁTRICA: Criterios de inclusión: i) pacientes diagnosticados de DAAT, de acuerdo con las recomendaciones de la ATS/ERS/SEPAR (8); ii) individuos control sanos sin antecedentes o hallazgos clínicos que sugieran enfermedad pulmonar o hepática.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos ADULTOS: Criterios de inclusión: i) pacientes diagnosticados de DAAT, de acuerdo con las recomendaciones de la ATS/ERS/SEPAR; ii) pacientes con DAAT sin enfisema, iii) pacientes con DAAT con enfisema sin tratamiento, iv) pacientes con DAAT con enfisema con tratamiento; v) individuos control sanos sin antecedentes o hallazgos clínicos que sugieran enfermedad pulmonar o hepática; vi) EPOC no relacionada con el DAAT.

Los criterios de exclusión aplicables a ambos grupos son los siguientes: i) disfunción cardíaca, ii) infección activa, iii) enfermedades autoinmunes; iv) trastornos neurológicos; v) trastornos psiquiátricos; vi) cáncer; vii) tratamiento con antioxidantes los tres meses previos a la toma de muestra biológica; viii) cirugía los tres meses previos a la toma de muestra biológica, debido a que es estos aspectos pueden alterar los niveles de estrés oxidativo.

El objetivo de incluir tanto a pacientes como a voluntarios sanos en edad pediátrica, es el hecho de que el estrés oxidativo se encuentra afectado por la edad y diversos factores ambientales como la ingesta de alcohol y el consumo de tabaco, los cuales podrían actuar como factores de confusión en el estudio.

3.1.4. Cálculo del tamaño muestral

El tamaño muestral para un nivel de confianza del 95%, con un error alfa de 0,05 y un error beta de 0,10 se estimó en 20 pacientes por grupo.

3.2. Toma de la muestra, aislamiento y cultivo de neutrófilos

La toma de la muestra se realizó en los servicios de los hospitales participantes detallados anteriormente. Se recogieron 3 tubos de 3ml de sangre total anticoagulada con k2-EDTA.

Los neutrófilos se purificaron a partir de la sangre total anticoagulada, mediante selección inmunomagnética negativa. Para ello, se utilizó el *kit* de aislamiento de neutrófilos humanos EasySep™ (#19666; StemCell Technologies), el cual contiene dos reactivos: un cóctel de anticuerpos monoclonales, incluyendo un anticuerpo bloqueador del receptor Fc (fragmento cristalizante), en tampón fosfato salino (PBS), y una suspensión de partículas magnéticas (Rapid Spheres™). El medio utilizado para el aislamiento fue el PBS, sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} para evitar la activación neutrofílica. El aislamiento de los neutrófilos se realizó en condiciones de esterilidad y a temperatura ambiente. Se incubaron 9 ml de sangre junto a 350 μl de ambos reactivos, el cóctel de aislamiento y las partículas magnéticas, durante 5 minutos en un Falcon de 50ml. Posteriormente, se ajustó el volumen hasta 35 ml con PBS y se colocó en el imán (#18002; StemCell Technologies) durante 10 minutos. A continuación, se transfirió el sobrenadante de esta primera purificación, evitando tocar las paredes del frasco donde quedan retenidos los restos sanguíneos, a un nuevo Falcon de 50 ml. De nuevo, se añadieron 350 μl de la solución de partículas magnéticas y se incubó durante 5 minutos antes de colocarlo durante otros 5 minutos más en el imán. Finalmente, se

MATERIAL Y MÉTODOS

transfirió el sobrenadante a un nuevo Falcon de 50 ml y se incubó en el imán durante 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se centrifugó durante 8 minutos a 600 x g para sedimentar los neutrófilos aislados.

La pureza de los neutrófilos aislados se comprobó mediante citometría de flujo (LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences)) utilizando un anticuerpo monoclonal anti CD45 (PE anti-human CD45 Antibody; #304007; BioLegend) que se utiliza como marcador de los leucocitos totales, siendo mayor la expresión en los linfocitos, y otro anticuerpo monoclonal anti CD16 (APC anti-human CD16 Antibody; #360705; BioLegend), específico de los neutrófilos.

Tras el aislamiento, se procedió al conteo de los neutrófilos mediante una cámara de Neubauer mejorada y se determinó su viabilidad por exclusión con azul de tripán. Las células se dividieron en dos frascos T25 previamente siliconados (Sigmacote®; #SL2-100ml; Sigma-aldrich) para evitar la activación neutrofílica y se añadió medio de cultivo RPMI-1640 (#R8758; Sigma-aldrich) suplementado con 10% suero bobino fetal inactivado (F7524; Sigma-aldrich), 1% piruvato sódico (S8636; Sigma-aldrich) y 1% aminoácidos no esenciales (M7145; Sigma-aldrich), para cultivar ambos en las dos condiciones experimentales que se van a comparar en el estudio.

Los neutrófilos se cultivaron a una concentración de 900.000 células/ml durante 4hrs a 37°C, uno de los frascos en condiciones atmosféricas ambientales o normoxia (5% CO₂, 21% O₂), utilizando una estufa de cultivo standard, y el segundo frasco en condiciones de

MATERIAL Y MÉTODOS

hipoxia (5% CO₂, 1% O₂) para lo cual se utilizó el incubador Forma™ Steri-Cycle™ i160 (Thermo Scientific). El medio de cultivo añadido a los frascos en condiciones de hipoxia, se incubó en las condiciones correspondientes las 3hrs previas al cultivo para facilitar el intercambio gaseoso.

3.3. Activación de los neutrófilos y almacenamiento de las muestras

La activación de los neutrófilos se realizó según el protocolo descrito por K Hoenderdos *et al* (57). Tras la incubación de los neutrófilos en las condiciones experimentales, se estimularon con TNF- α (20 ng/ml) (#T6677; Sigma-aldrich) y el compuesto formilado fMLP (100 nM) (#F3506; Sigma-aldrich) durante 30 y 10 minutos, respectivamente. Esta activación permite realizar, de forma adecuada, las posteriores medidas de la degranulación (57,58).

Una vez finalizados los tiempos de incubación del cultivo, se reservaron alrededor de 1,5 millones de células para la realización de las determinaciones del perfil oxidativo mediante citometría de flujo. La muestra restante se centrifugó a 600xg durante 10 minutos para separar el sobrenadante y las células que fueron almacenados a -80 °C para las determinaciones posteriores. El sobrenadante de los cultivos celulares se utilizó para las determinaciones de la degranulación y liberación de citoquinas por parte de los neutrófilos mientras que las células se utilizaron para el estudio del Ca²⁺ intracelular, el perfil oxidativo y los mecanismos antioxidantes.

3.4. Determinación de la degranulación de los neutrófilos y liberación de citoquinas

La degranulación se evaluó midiendo en el sobrenadante de los cultivos celulares la actividad EN y la cantidad de MPO, lactoferrina y MMP-9. También se determinó la cantidad de AAT liberada por los neutrófilos aislados. Previamente a la realización de las estas determinaciones, se centrifugaron los sobrenadantes de cada cultivo a 2000 x g durante 10 minutos a 4 °C para eliminar los posibles restos celulares. Asimismo, se estableció la cantidad de proteína total presente en los sobrenadantes, mediante el método de Bradford. Todos estos ensayos tienen en común que la determinación de la proteína de interés se obtiene por comparación con una curva estándar. Cada muestra fue testada por duplicado.

3.4.1. Determinación de la actividad elastasa

La liberación de EN activa se determinó usando el *kit* comercial **Neutrophil Elastase Activity Assay Kit (#600610; Cayman chemical)** siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este *kit* se basa en el uso de un sustrato no fluorescente específico de la EN, (Z-Ala-Ala-Ala-Ala)₂Rh110 que, al unirse a dicha proteasa, da lugar a un compuesto fluorescente (R110), siendo la cantidad de fluorescencia emitida proporcional a la actividad EN de la muestra.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar el ensayo, se utilizó una placa con base negra (#10011297; Cayman chemical), a la que se transfieren, tanto las muestras (previamente diluidas al 3:100) como cada punto de la curva estándar (0-10 mU/ml de EN humana). La placa se incubó durante 1.5hrs a 37°C junto al sustrato. Tras este tiempo de incubación, la fluorescencia se determinó utilizando el fluorímetro SpectraMax Gemini XPS (Molecular Devices) con los parámetros correspondientes (ex,485nm; em,525nm).

3.4.2. Determinación de la actividad mieloperoxidasa

La concentración de la MPO en las muestras procedentes de pacientes pediátricos se estableció mediante el *kit* comercial **EnzChek® Myeloperoxidase (MPO) Activity Assay Kit** (#E33856; Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Cuando la MPO reacciona con H₂O₂ forma los intermediarios MPO-I y MPO-II que oxidan al reactivo Amplex® Ultrared produciendo un compuesto fluorescente que puede ser detectado.

Para realizar el ensayo, se transfirieron tanto las muestras como cada punto de curva estándar (0-200 ng/ml m de MPO) a los pocillos de una placa de base negra y se combinaron con el reactivo Amplex® Ultrared. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad. Tras este tiempo, se añadió un inhibidor de la peroxidación y se midió la fluorescencia mediante el fluorímetro SpectraMax Gemini XPS (Molecular Devices) con los parámetros

MATERIAL Y MÉTODOS

correspondientes (ex,530nm; em,590nm). La fluorescencia emitida por las muestras se compara con aquella emitida por la curva estándar para determinar la concentración de MPO.

3.4.3. Determinación de la concentración de lactoferrina

La lactoferrina presente en el medio de cultivo se midió mediante el *kit* comercial **Human Lactoferrin ELISA Kit** (#ab200015; Abcam), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Para comenzar el ensayo, las muestras (previamente diluidas 1:500) y la curva estándar (0-20 ng/ml de lactoferrina humana) se añadieron a los pocillos de la placa incluida en el *kit*, que contiene un anticuerpo primario contra la lactoferrina ligado al pocillo, junto a un cóctel de anticuerpos: el anticuerpo de captura que se une al analito, en este caso la lactoferrina y el de detección que está conjugado a la enzima HRP. Se incubó la placa durante 1hr a temperatura ambiente y en agitación y se realizaron 3 lavados con la solución de lavado proporcionada por el fabricante para eliminar los restos de anticuerpos no unidos. Tras ello, se agregó a los pocillos el sustrato 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Tras 10 minutos de incubación en oscuridad, en los que la peroxidasa de rábano picante (HRP) cataliza la reacción dando lugar a un producto coloreado, se detiene la reacción con la solución de parada. Por último, se leyó la absorbancia usando el espectrofotómetro Spectramax Plus 384 (Molecular Devices).

MATERIAL Y MÉTODOS

3.4.4. Determinación de la concentración de metaloproteasa-9 de matriz

La liberación MMP-9 se evaluó utilizando un *kit* ELISA de tipo *sándwich* comercial **MMP-9 Human ELISA Kit** (#BMS2016-2; ThermoFisher Scientific).

Para comenzar el ensayo, se realizaron dos lavados de los pocillos, que se encuentran recubiertos por un anticuerpo anti MMP-9 humana. Se añadieron tanto las muestras (previamente diluidas al 1:100) como los puntos de la curva estándar (0-15 ng/ml de MMP-9 humana) en los pocillos correspondientes. Se agregó la solución de biotina conjugada y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 2hrs en agitación. Tras dicha incubación, la biotina se une a la MMP-9 que se encuentra ligada al anticuerpo presente en el pocillo. A continuación, se efectuaron 4 lavados con la solución de lavado proporcionada por el fabricante del *kit* para eliminar los restos de biotina no unidos y se añadió a los pocillos una solución de estreptavidina-HRP durante 1hr, a temperatura ambiente en agitación, para favorecer la unión a los complejos. Se realizaron 4 lavados y se incubó con el sustrato TMB a temperatura ambiente durante 10 minutos en oscuridad. La reacción colorimétrica se paró añadiendo ácido fosfórico y se determinó la absorbancia a 450nm con el Spectramax Plus 384 (Molecular Devices).

MATERIAL Y MÉTODOS

3.4.5. Determinación de la concentración de AAT

La liberación de AAT al medio de cultivo se determinó mediante un *kit* comercial **Human alpha 1 Antitrypsin ELISA Kit (SERPINA1)** (#ab108799; Abcam), que consiste en un ensayo ELISA de tipo *sándwich*.

Para realizar el ensayo, se añadieron tanto las muestras (diluidas previamente al 1:500), como los puntos de la curva estándar (0-25 ng/ml de AAT) en los pocillos de la placa que se encuentran recubiertos por un anticuerpo anti AAT. Se incubaron a temperatura ambiente, durante 2hrs en agitación. Posteriormente, se realizaron 5 lavados con la solución de lavado proporcionada por el fabricante y se agregó el anticuerpo de detección biotinilado. Se incubó a temperatura ambiente durante 1hr en agitación. Tras dicha incubación, el anticuerpo biotinilado se habrá unido a la AAT, presente en muestras y curva estándar, la cual se encuentra ligada al anticuerpo presente en el pocillo. Entonces se agregó estreptavidina-HRP a los pocillos previamente lavados 5 veces para eliminar los restos no unidos. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación para favorecer la unión a los complejos. De nuevo se realizaron 5 lavados, antes de la última incubación, en este caso con el sustrato a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras dicha incubación, que habrá producido la reacción colorimétrica, se añadió la solución de parada. Por último, se determinó la absorbancia a 450nm con el Spectramax Plus 384 (Molecular Devices).

MATERIAL Y MÉTODOS

3.4.6. Producción y secreción de citoquinas

Los niveles de citoquinas liberadas en el sobrenadante de los cultivos celulares de los neutrófilos en situaciones de normoxia e hipoxia, se determinaron con el *kit* Cytokine Human Magnetic 30-Plex Panel for Luminex™ Platform (#LHC6003M; Invitrogen) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

Los niveles de TNF- α se confirmaron mediante ELISA, utilizando el *kit* comercial **Human TNF-alpha DuoSet ELISA** (#DY210; Bio-technne). Previamente a la realización del ensayo, se recubrieron los pocillos de la placa con el anticuerpo de captura anti TNF- α (durante 24hrs a temperatura ambiente) y tras 3 lavados con una solución de 0,05% *Tween-20*® en PBS para eliminar los restos de anticuerpo no unido, los pocillos se bloquearon con 1% de albúmina sérica bovina (BSA) resuspendida en PBS durante 1 hr. Para la realización del ensayo, se añadieron en los pocillos de la placa, tanto las muestras (diluidas previamente al 1:100) como los puntos de la curva estándar (0-2000 pg/ml de TNF- α) y se incubaron a temperatura ambiente, durante 2hrs. Posteriormente, se realizaron, de nuevo, 3 lavados y se agregó el anticuerpo de detección biotinilado que se incubó a temperatura ambiente durante 2 hrs. Tras dicha incubación y los lavados pertinentes, se añadió estreptavidina-HRP y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. De nuevo se realizaron 3 lavados, antes de la última incubación, en este caso con el sustrato a temperatura ambiente, durante otros 20 minutos. Tras dicha incubación, se habrá producido la reacción colorimétrica y se añadió

MATERIAL Y MÉTODOS

la solución de parada (2 N H₂SO₄). Por último, se determinó la absorbancia a 450nm con el Spectramax Plus 384 (Molecular Devices).

3.4.7. Determinación de la concentración de proteínas: Método de Bradford

Las proteínas totales presentes en el sobrenadante de los cultivos fueron cuantificadas mediante el método de Bradford (1976) (144), adaptado a placas de 96 pocillos. Es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de proteínas en el cual se añade a la muestra el reactivo *Coomasie Brilliant Blue G250* (#5000001; Bio-Rad) que, en condiciones ácidas, se une a los residuos básicos y aromáticos de las proteínas produciendo un cambio colorimétrico, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer.

Se transfirieron las muestras y cada punto de una curva estándar (0-2 mg/ml de BSA) junto a dicho reactivo, a los pocillos correspondientes de una placa de 96 pocillos; se incubó durante 5 minutos y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595nm.

3.5. Determinación del perfil oxidativo en los neutrófilos mediante citometría de flujo

La determinación del perfil oxidativo, así como los niveles de Ca^{2+} intracelular y la viabilidad celular, en neutrófilos de pacientes DAAT y voluntarios sanos se realizó mediante citometría de flujo. La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico que tiene como finalidad la medición de las características físicas y químicas de las células o partículas biológicas en suspensión, que producen una señal de forma individual al interferir con un rayo de luz.

Todos los ensayos por citometría de flujo se realizaron utilizando el citómetro LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences). Las muestras fueron estudiadas bajo condiciones basales y tras la exposición *in vitro* a agentes pro oxidantes o desacoplantes (desacoplan la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria, reflejando una despolarización del potencial de membrana), utilizados como controles positivos. El *software* empleado para la adquisición de datos en el citómetro fue FACSDiva 4.0. Los datos obtenidos fueron analizados empleando el *software* FLOWJO V.10.1.

3.5.1. Reactivos

El estudio del perfil oxidativo en los neutrófilos aislados se basa en el uso de sondas fluorescentes. Principalmente se basan en la adición de un compuesto no fluorescente que es rápidamente oxidado

MATERIAL Y MÉTODOS

o reducido al reaccionar con especies oxidantes presentes en la célula, dando lugar a un compuesto fluorescente cuya emisión es detectada por el citómetro de flujo. Podemos clasificar las sondas utilizadas según la especie con la que reacciona.

a) Detección de las especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS)

La Dihidrorodamina 123 (**DHR-123**) (#D23806; Thermofisher Scientific) es una sonda no fluorescente que puede difundir pasivamente a través de las membranas, dónde se oxida a rodamina 123 catiónica acumulándose en las mitocondrias y emitiendo fluorescencia. Es un indicador de ROS, principalmente ONOO⁻ (145), que se excita con una longitud de onda de 480 nm y emite a una longitud de onda de 530nm.

El Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (**H₂DCFDA**) (#D399; Thermofisher Scientific) es una sonda no fluorescente capaz de penetrar en la célula, donde las esterasas intracelulares lo transforman en DCF, que es altamente fluorescente. Se excita con una longitud de onda de 485 nm y emite a una longitud de onda de 530 nm. Esta sonda es ampliamente utilizada para la detección de hidroperóxidos intracelulares.

La Dihidroetidina (**HE**) (#D1168; Thermofisher Scientific) es una sonda fluorescente que se oxida selectivamente por el O₂⁻ - presente en el citosol de células vivas- a 2-OH-etidio el cual se une al

MATERIAL Y MÉTODOS

ADN (146), emitiendo fluorescencia a una longitud de onda de 605 nm cuando se excita a 518 nm.

b) Generación de especies reactivas derivadas del nitrógeno (RNS)

El 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (**DAF-FM**) (#D23841; Thermofisher Scientific) es un compuesto no fluorescente que al reaccionar con NO se transforma en benzotriazol, un compuesto fluorescente (147) que emite fluorescencia a 515nm al excitarlo a 495 nm.

c) Detección de tioles

El 5-clorometil fluorescein diacetato (**CMFDA**) (#C2925; Thermofisher Scientific) se utiliza como indicador de los niveles de tioles reducidos intracelulares (148), siendo sus espectros de excitación/emisión 492 y 517 nm respectivamente.

Monoclorobimano (**MCB**) (#M1381MP; Thermofisher Scientific) reacciona rápidamente con diversos tioles de bajo peso molecular, siendo más específico para GSH (149). Los espectros de excitación/emisión son 394 y 490 nm respectivamente.

d) Función mitocondrial

Tetrametil rodamina metilester (**TMRM**) (#T668; Themofisher Scientific) es un fluorocromo derivado de la tetrametil rodamina de intensa fluorescencia que se acumula en el interior de la mitocondria en proporción directa al potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

MATERIAL Y MÉTODOS

(150). Las longitudes de onda de excitación y emisión son 630nm y 488nm respectivamente.

MitoSOX (#M36008; Themofisher Scientific) es una sonda capaz de penetrar en las células vivas, siendo introducido selectivamente en las mitocondrias donde es oxidado por el O_2^- mitocondrial (151). Esta molécula es excitada a una longitud de onda de 510 y emite a 580nm.

e) Calcio intracelular

Fluo-4 (#F14201; Themofisher Scientific) es un indicador de Ca^{2+} , al unirse a Ca^{2+} se observa un aumento de la fluorescencia, emitiendo a una longitud de onda de 506 nm al ser excitado a 494nm (152).

f) Daño oxidativo en las biomoléculas

BODIPY 665/676 (#B3932; Themofisher Scientific) se utiliza como indicador de la peroxidación lipídica. Es una sonda lipofílica que presenta un cambio en la fluorescencia al interactuar con radicales peroxilo. (153).

Fluoresceína-5-tiosemicarbazida (**FTC**) (#46985; Sigma-aldrich) es una molécula que emite fluorescencia al interactuar con los grupos carbonilados de las proteínas (154) a una longitud de onda de 516nm, al ser excitada a 492 nm.

MATERIAL Y MÉTODOS

g) Viabilidad

6'-Diamidino-2-fenilindol dihidroclorido (**DAPI**) (#D9542; Sigma-aldrich) o Ioduro de propidio (**PI**) (#P4170; Sigma-aldrich), se unen a los ácidos nucleicos emitiendo fluorescencia. Estos compuestos fueron utilizados para excluir las células muertas en cada uno de los análisis.

El estudio de la viabilidad celular y muerte celular se realizó con un kit comercial para citometría de flujo (**FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI**; ANXVKF-100T; Immunostep).

Los fluorocromos se almacenaban a -20°C , a las siguientes concentraciones (diluidas en dimetilsulfóxido (DMSO)): DHR-123 (5mM), H_2DCFDA (1mg/ml), HE(1mg/ml), DAF-FM (1,25mM), CMFDA(10 μM), MCB (5nM), TMRM (240 μM), MitoSOX (0,5mM), Fluo-4 (50 μM), BODIPY 665/676 (1mM), FTC(1mM), DAPI (1mg/ml). Tanto Anexina V como PI (1mg/ml) se guardaban a 4°C .

Para las medidas de los controles positivos se utilizaron los siguientes inductores: NOR-1 (#163032-70-0; Santa Cruz Biotechnology) como dador de NO, Plumbagina (PB) (#P7262; Sigma-aldrich) para aumentar los niveles de O_2^- , carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) (#C2920; Sigma-aldrich) como reductor del $\Delta\Psi_m$, el ionóforo Ionomicina (#I24222; Thermofisher Scientific) como inductor del influjo de Ca^{2+} , ácido ascórbico y FeSO_4 para aumentar los niveles de proteínas carboniladas, dietil maleato (DEM) (#D97703; Sigma-aldrich) como depleccionador de tioles

MATERIAL Y MÉTODOS

reducidos y tertbutil hidroperóxido (t-BHP) (458139; Sigma-aldrich) fue utilizado como control para varios experimentos al ser pro oxidante químico (155).

Los inductores NOR-1, PB, FCCP e Ionomicina se almacenaron a -20°C , a las siguientes concentraciones (diluidas en DMSO): NOR-1 (1mg/ml), Plumbagina (1mg/ml), FCCP (10mM) e Ionomicina (1mg/ml). El ácido ascórbico (100mM), FeSO_4 (446 μM), DEM (50%) y t-BHP (7,7mM), diluidos en PBS, se guardaron a 4°C .

3.5.2. Marcaje fluorescente

3.5.2.1. Medidas basales

La determinación de los niveles basales de ROS, RNS, tioles intracelulares, función mitocondrial, Ca^{2+} intracelular y daño oxidativo en las biomoléculas de los neutrófilos aislados, se realizó en placas de 96 pocillos. En cada pocillo se añadieron 40.000 células en RPMI-1640 suplementado junto con los fluoróforos correspondientes en un volumen final de 200 μl (Tabla 1). Se incubaron a 37°C durante 20 minutos en condiciones de hipoxia o de normoxia según la muestra. Previamente a ser adquiridas por citometría, se añadía a las muestras DAPI o PI para excluir del análisis las células muertas. Las muestras fueron procesadas con el citómetro de flujo ajustado con los parámetros adecuados (Tabla 1).

Las concentraciones finales de trabajo fueron: DHR-123 (250ng/ml), H_2DCFDA (3,15 $\mu\text{g/ml}$), HE (3,15 $\mu\text{g/ml}$), DAF-FM (1,25 μM),

MATERIAL Y MÉTODOS

CMFDA (31,5nM), MCB (0,016nM), TMRM (756nM), MitoSOX (800nM), Fluo-4 (625nM), BODIPY 665/676 (1 μ M), FTC (1 μ M), DAPI (800ng/ml) y PI (8 μ g/ml).

3.5.2.1. Controles positivos

Se prepararon las muestras en las mismas condiciones que las medidas basales, aunque con una incubación previa con el inductor correspondiente. La placa con los inductores se incubó a 37°C durante 15 minutos (excepto para la inducción de MCB y FTC que se mantuvo durante 60 minutos y 80 minutos respectivamente), tras ello se añadieron los fluoróforos correspondientes y se incubaron de nuevo a 37°C durante otros 20 minutos. Previamente a la adquisición de la muestra por el citómetro de flujo correctamente ajustado, se añadía DAPI o PI para excluir las células muertas de los análisis (Tabla 1).

Los controles positivos para las medidas con Fluo-4, DHR-123 y DAF-FM se realizaron mediante cinéticas. Para ello, se prepararon por separado en tubos de citometría, las muestras en las mismas condiciones que para las medidas basales incluyendo la incubación con el fluoróforo correspondiente. Se añadió DAPI y se comenzó la adquisición con el citómetro de flujo ajustado correctamente para obtener la fluorescencia basal. A continuación, se detuvo la adquisición de la muestra para añadir los inductores adecuados (Tabla 1) y se reanudó la adquisición.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las concentraciones de trabajo finales de los inductores fueron: NOR-1 (10µg/ml para DAF-FM y 17,5 µg/ml para DHR-123), PB (2,8µg/ml), FCCP (65µM), Ionomicina (45µg/ml), ácido ascórbico (0,5mM), FeSO₄ (4 µM), DEM (0,1mM) y t-BHP (125µM para H₂DCFH y CMFDA; 0,25mM para BODIPY 656/676).

3.5.1. Ensayo de apoptosis

Para estudiar la apoptosis y muerte celular inducida por las condiciones experimentales se preparó un tubo por separado con 20.000 células diluidas con *Annexin V binding buffer* en un volumen final de 200 µl, se añadió anexina V y PI y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, las muestras fueron adquiridas con el citómetro de flujo ajustado con los parámetros adecuados (Tabla 1).

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 1 . Resumen del método de análisis por citometría de flujo

Parámetro	Sonda	Inductor	Marcador Muerte	Detector	
Generación ROS	ONOO^-	DHR-123	PB + NOR-1	DAPI	FITC
	H_2O_2	H_2DCFDA	t-BHP	DAPI	FITC
	O_2^-	HE	PB	DAPI	PE-Cy7
Generación RNS	NO	DAF-FM	NOR-1	DAPI	FITC
Detección tioles	Tioles	CMFDA	t-BHP	DAPI	FITC
	GSH	MCB	DEM	PI	BV421

MATERIAL Y MÉTODOS

Parámetro	Sonda	Inductor	Marcador Muerte	Detector	
Función mitocondrial	O_2^- mitocondrial	MitoSOX	PB	DAPI	PE-Cy7
	$\Delta\Psi_m$	TMRM	FCCP	DAPI	PE-Cy7
Calcio intracelular	Ca^{2+}	Fluo-4	Ionomicina	DAPI	FITC
Daño oxidativo	Lípidos peroxidados	BODIPY 665/676	t-BHP	DAPI	PE/APC
	Proteínas carboniladas	FTC	Ac. Ascórbico + $FeSO_4$	DAPI	FITC
Viabilidad	Apoptosis	Anexina + PI	-	-	FITC/PE-Cy7

3.6. Determinación de la expresión a nivel de mRNA de los principales sistemas enzimáticos antioxidantes celulares.

Para valorar la expresión relativa de las proteínas de interés, se utilizó la técnica de la PCR cuantitativa a tiempo real (q-RT-PCR), que permite monitorizar el progreso de la PCR mediante el aumento de la fluorescencia. Para la detección de los productos de la PCR en nuestros experimentos, se utilizaron sondas Taqman[®]™ como marcador fluorescente. En este caso es necesaria una hibridación específica entre la sonda y el gen de interés para que se produzca la señal fluorescente de forma que al aumentar el número de copias de ADN diana, aumenta la señal emitida, obteniendo una cuantificación relativa respecto a un gen calibrador invariable (*housekeeping*), en este caso β -2-microglobulina (β 2M), que no sufre cambios bajo las condiciones experimentales.

Se utilizó para ello, el sistema de alto rendimiento *Biomark HD* (Fluidigm), que requiere de unos pasos previos a la PCR propiamente dicha. Además de la extracción y retrotranscripción del ARNm, precisa una preamplificación de las secuencias de interés. Este sistema utiliza las llamadas IFC del inglés "*Integrated Fluidic Circuit*" en vez de las placas de 384 pocillos convencionales.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.6.1. Extracción de ARNm y retrotranscripción

Se realizó la extracción del ARN contenido en los neutrófilos cultivados tanto en condiciones de normoxia como hipoxia, con el fin de determinar, mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), la cantidad relativa de dicho ARNm de las distintas proteínas implicadas en los mecanismos antioxidantes de los neutrófilos o relacionadas con situaciones de hipoxia.

Para este experimento, se tomaron 700.000 células, conservadas hasta este momento a -80°C , y se realizó la extracción de su contenido en ARNm, ADN y proteínas con el *kit* comercial NucleoSpin TriPrep (#740966.50; Macherey-Nagel), siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial. Para cuantificar y determinar la calidad del ARNm extraído se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific).

Posteriormente, se realizó la transcripción reversa mediante el *kit* comercial de síntesis de ADNc (High capacity RNA-to-cDNA Kit; #4387406; Thermofisher Scientific) siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial, partiendo de 20 ng de ARN de cada muestra.

3.6.2. Preamplificación

El sistema Biomark HD, debido a que trabaja con volúmenes de reacción de la escala de nanolitros, requiere que haya un mínimo de 800 copias/ μl de las secuencias diana en las muestras preparadas. Por ello, previamente a la q-RT-PCR, se realizó una preamplificación de

MATERIAL Y MÉTODOS

las secuencias de interés de cada muestra para incrementar su número de copias y hacerlas detectables.

Se combinaron cada una de las sondas Taqman[®]™ para los genes de interés y una *Master Mix* de Preamplificación (#100-5744; Fluidigm), junto con el ADNc de cada muestra. El programa de preamplificación se llevó a cabo utilizando el termociclador *ProFlex PCR System* (Thermofisher Scientific) (Tabla 2). Tras 18 ciclos de preamplificación, cada muestra se diluyó 1:5 con agua estéril destilada, según los requerimientos de este sistema de alto rendimiento.

Tabla 2 . Programa de preamplificación

	Condición	Temperatura	Tiempo
		95 °C	2 min
18 ciclos	Desnaturalización	95 °C	15 seg
	Anillamiento/Extensión	60 °C	4 min
		4 °C	∞

3.6.3. Preparación previa de ensayos, muestras e IFC

El *chip*, denominado por la casa comercial 192.24 *Dynamic Array™ integrated fluidic circuit* (IFC) (Figura 5), utilizado para el ensayo de expresión génica (#100-6308; Fluidigm), se preparó convenientemente introduciendo la mezcla fluidica (*Control Line Fluid Kit—96.96* (150 μ L); #89000021; Fluidigm) según las instrucciones del fabricante.

Para la preparación de los ensayos, se combinó cada una de las sondas Taqman[®]™ (Tabla 3) con el reactivo *2X Assay Loading Reagent* (#PN 100-5359; Fluidigm) por separado. Posteriormente, se transfirieron 3 μ l de la mezcla de reacción en los pocillos correspondientes para los ensayos en la IFC.

Para la preparación de las muestras, se combinaron los cDNA preamplificados de cada muestra con la *Master Mix TaqMan™* para expresión génica (#4369016; ThermoFisher Scientific) y el reactivo *20X GE Sample Loading Reagent* (#100-6311; Fluidigm). Posteriormente, se transfirieron 3 μ l de la mezcla de reacción a los pocillos correspondientes para las muestras en el IFC. Cada muestra se analizó por duplicado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 3 . Genes testados mediante q-RT-PCR. Sondas Taqman®TM (Thermofisher Scientific).

Gen	Proteína diana	Referencia	Función
B2M	β -2-microglobulina	Hs00187842_m1	Gen calibrador
SOD1	Superóxido dismutasa	Hs00533490_m1	Respuesta antioxidante
SOD2	Superóxido dismutasa mitocondrial	Hs00167309_m1	Respuesta antioxidante
NFE2L2	Factor nuclear eritroide tipo 2 (Nrf2)	Hs00232352_m1	Respuesta antioxidante
CAT	Catalasa	Hs00156308_m1	Respuesta antioxidante
GPX1	Glutación peroxidasa 1	Hs00829989_gH	Respuesta antioxidante
GR	Glutación reductasa	Hs00167317_m1	Respuesta antioxidante

Una vez transferidos los ensayos y muestras a sus pocillos correspondientes, se añadieron al IFC los fluidos necesarios (*Actuation Fluid* y *Pressure Fluid*), se colocaron en el aparato de preparación *Juno* (Fluidigm) y se ejecutó el programa *Load Mix 192.24 GE* para combinar las diferentes muestras y ensayos, a través de un circuito de microfluídica, en las diferentes cámaras donde tendrán lugar las reacciones de la q-RT-PCR.

MATERIAL Y MÉTODOS



Figura 5. *192.24 Dynamic Array™ integrated fluidic circuit (IFC).*
(Fuente: www.fluidigm.com)

Una vez finalizada la preparación del IFC, este se transfiere a la plataforma analítica, Biomark HD (Fluidigm), donde se lleva a cabo la reacción q-RT-PCR propiamente dicha, ejecutando el programa *GE 192x24 Standard v1* (Tabla 4).

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 4 . Programa q-RT-PCR

Condición		Temperatura	Tiempo
		50 °C	2 min
		95 °C	10 min
40 ciclos	Desnaturalización	95 °C	15 seg
	Anillamiento/Extensión	60 °C	60 seg
		4 °C	∞

La expresión relativa del ARNm de las proteínas testadas en cada condición se expresó como $2^{-\Delta Ct} = Ct$ de la proteína – Ct calibrador, con el gen $\beta 2M$ como calibrador. A partir de este valor, se calculó la expresión relativa de ARNm con el método del $2^{-\Delta \Delta Ct}$ (156).

3.7. Análisis estadístico

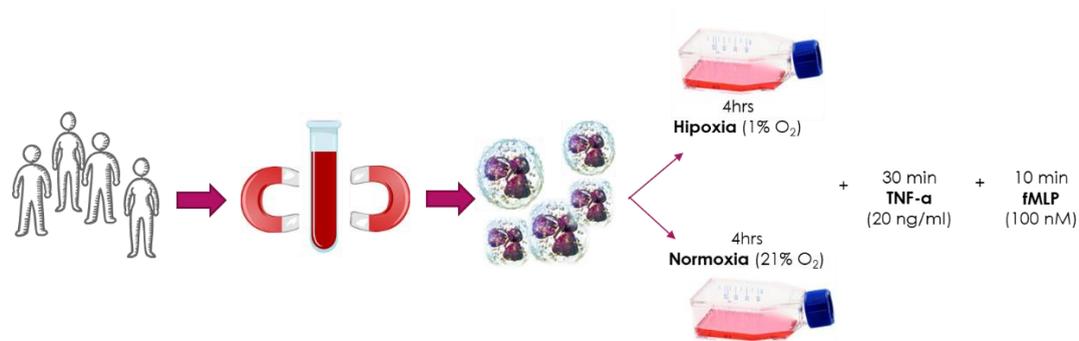
El análisis estadístico se realizó con el *software* GraphPad Prism 9.0 para Windows. En todos los test se ha establecido un nivel de significación estadística del 5% ($\alpha=0,05$). La normalidad de los grupos se estudió mediante la aplicación del test de Shapiro-Wilk. Las comparaciones entre más de dos grupos se realizaron mediante el test ANOVA, en los casos en los que las variables seguían una distribución normal, mientras que se utilizó el test de Kruskal-Wallis, en aquellos casos en los que las variables seguían una distribución distinta de la normal. La comparación entre dos grupos se realizó mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney, cuando no se cumplía el supuesto de normalidad, y el test t-Student, para los casos en los que se cumplía la normalidad. Se utilizó el test 2-way ANOVA para estudiar la relación

MATERIAL Y MÉTODOS

entre una variable dependiente cuantitativa y dos variables independientes cualitativas, cada uno con varios niveles. Los resultados se muestran como media \pm SEM.

Los resultados de los análisis comparativos para cada parámetro de estudio se muestran como: A) los niveles del parámetro correspondiente bajo condiciones de hipoxia, B) los niveles del parámetro correspondiente bajo condiciones de normoxia, C) cociente entre los niveles del parámetro correspondiente en condiciones de hipoxia frente a la normoxia de cada paciente, D) representación de la media de los valores en hipoxia y normoxia en cada grupo de estudio. La representación del cociente entre hipoxia y normoxia permiten estudiar si existen posibles diferencias en el efecto de la hipoxia entre los diferentes fenotipos, mientras que la representación de las medias en hipoxia y normoxia permiten evaluar las diferencias dentro de cada grupo de estudio entre hipoxia y normoxia.

MATERIAL Y MÉTODOS



SOBRENADANTE DEL CULTIVO			CÉLULAS		
Estudio	Método	Parámetro	Estudio	Método	Parámetro
Degranulación de los neutrófilos	ELISA	<ul style="list-style-type: none"> AAT Elastasa MPO Lactoferrina MMP-9 	Perfil oxidativo de los neutrófilos	Citometría de flujo	<ul style="list-style-type: none"> ROS RNS Función mitocondrial Daño oxidativo
Producción de citoquinas	ELISA Luminex™	<ul style="list-style-type: none"> TNF-α IL-8 	Defensa antioxidante	Citometría de flujo q-RT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> Tioles Enzimas antioxidantes
			Calcio intracelular	Citometría de flujo	<ul style="list-style-type: none"> Calcio intracelular
			Viabilidad celular	Citometría de flujo	<ul style="list-style-type: none"> Apoptosis

Figura 6. Esquema general de los métodos utilizados.

4. RESULTADOS

RESULTADOS

4.1. Pacientes

4.1.1. Datos demográficos y clínicos de pacientes y controles en edad pediátrica

En el presente estudio han participado 7 voluntarios sanos con fenotipo MM y 54 pacientes en edad pediátrica, distribuidos de la siguiente manera: 31 pacientes MZ; 8 pacientes SZ; 15 pacientes ZZ.

Acercas de datos demográficos sobre los niños voluntarios reclutados, la media de edad en el grupo control es de 11 años, mientras que para los grupos de pacientes MZ, SZ y ZZ es de 8, 10 y 7; respectivamente. Los p-valores para los análisis de contrastes de hipótesis (*Chi*-cuadrado para variables categóricas en el caso del sexo y ANOVA o Kruskal-Wallis para comparación de medias de varios grupos en el caso de la edad), revelaron que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio, en cuanto a sexo y edad (Tabla 5).

Por otro lado, en el caso de los pacientes, se recogieron datos relacionados con la enfermedad para valorar el estado respiratorio y hepático de los mismos en el momento del estudio. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio para los datos de enfermedad respiratoria evaluados mediante % FEV₁, % FVC, % FEV₁/FVC. Asimismo, tampoco se encontraron diferencias en el caso de los niveles de transaminasas (AST, ALT y GGP). Como era de esperar, tan solo se observaron diferencias significativas ($p=1,646e-008$) en los niveles de AAT de acuerdo al fenotipo de cada grupo de

RESULTADOS

estudio (MM, MZ, SZ, y ZZ) (Tabla 5). En el caso de los voluntarios sanos, aunque no se recogen en la tabla anterior, no presentaban signos de enfermedad pulmonar.

4.1.1. Datos demográficos y clínicos de pacientes y controles en edad adulta

En el presente estudio han participado 15 voluntarios sanos con fenotipo MM, 5 pacientes con EPOC no asociada al DAAT y 20 pacientes con DAAT distribuidos de la siguiente forma: 9 pacientes MZ, 6 pacientes ZZ sin EPOC y 5 pacientes ZZ con EPOC.

Acerca de datos demográficos sobre los adultos voluntarios reclutados, la media de edad en el grupo control es de 42 años, mientras que para los grupos de pacientes MZ, ZZ sin EPOC, ZZ con EPOC y MM con EPOC es de 48, 25, 52 y 57, respectivamente. Los p-valor para los análisis de contrastes de hipótesis (*Chi*-cuadrado para variables categóricas en el caso del sexo y ANOVA o Kruskal-Wallis para comparación de medias de varios grupos en el caso de la edad), no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio, en cuanto a sexo y edad (Tabla 6).

Como en el caso de los niños, también se recogieron ciertos datos relacionados con la enfermedad para valorar el estado respiratorio y hepático de los pacientes adultos en el momento del estudio. En este caso, se observaron diferencias estadísticamente significativas para % FEV₁ y % FEV₁/FVC ya que se incluyen grupos con enfermedad respiratoria. Sin embargo, no se encontraron diferencias

RESULTADOS

en el caso de los niveles de transaminasas (AST, ALT y GGP). Como era de esperar, también se observaron diferencias significativas ($p=7,735e-005$) en los niveles de AAT de acuerdo al fenotipo de cada grupo de estudio (MM, MZ, y ZZ) (Tabla 6). Cabe destacar que el grupo de pacientes ZZ con EPOC recibe tratamiento con terapia de reposición, en estos casos la obtención de la muestra se realizó en el momento previo a la administración del tratamiento y 5 días posteriores a la misma. Respecto a los datos clínicos de los controles adultos, aunque no se recogen en la tabla anterior, no presentaban signos de enfermedad pulmonar ni hepática.

RESULTADOS

Tabla 5 . Datos demográficos y clínicos de pacientes y controles en edad pediátrica.

Variable	MM	MZ	SZ	ZZ	p-valor
n	7	31	8	15	
Edad (años)	11±2,71	8± 0,74	10± 0,44	7± 0,80	0,06
Hombre/ Mujer	43%/57%	52%/48%	75%/25%	54%/46%	0,69
AAT (mg·dL ⁻¹)	148,5±5,50	85,27± 4,92	57,38± 3,15	26,22± 2,68	<0,0001
IMC (kg·m ⁻²)	16,1±1,23	17,47±0,51	17,24±0,50	17,50±1,08	0,99
FEV ₁ %	-	102,50±3,13	107,9±2,01	102,6±4,71	0,57
FVC %	-	98,69±2,05	100,1±2,69	98,44±6,2	0,59
FEV ₁ /FVC %	-	90,86±1,52	94,71±2,37	91,79±1,97	0,22

RESULTADOS

AST (U·L ⁻¹)	20±2,10	29,79±1,51	35,00±0,45	35,20±3,46	0,14
ALT (U·L ⁻¹)	23±2,45	22,76±3,18	22,14±1,64	32,33±6,36	0,11
GGT (U·L ⁻¹)	18±1,38	15,8±0,60	17,38±1,21	19,00±0,58	0,14
Vitamina A	40±5,96	34,83±2,31	32,50±4,50	39,80±4,99	0,69
Vitamina D	36,5±4,48	27,43±2,18	35,50±4,5	32,40±2,59	0,18
Vitamina E	9,25±0,63	10,87±0,55	10,40±0,8	11,72±0,64	0,14

Los datos se muestran como media±SEM. Los resultados que mostraron diferencias significativas ($p<0.05$) tras la aplicación del test ANOVA o Kruskal–Wallis, se han resaltado en negrita. La comparación de las proporciones se realizó mediante el test Chi-cuadrado. IMC: índice de masa corporal; FEV₁: Volumen espiratorio forzado en 1 segundo; FVC: capacidad vital forzada; AST: aspartato-aminotransferasa; ALT: alanina-aminotransferasa; GGT: γ -glutamyl-transferasa. AAT: rango normal 90-200 mg·dL⁻¹; FEV₁ y FVC: normal ≥ 80 % previsto; FEV₁/FVC%: normal >80 % del valor teórico; AST y ALT: rango normal 1-40 U·L⁻¹; GGT: rango normal 1-55 U·L⁻¹; vitamina A: rango normal 20-60 μ g/dl; vitamina D rango normal; 20-50 ng/ml; vitamina E rango normal: 5,5-17 mg/l.

RESULTADOS

Tabla 6 . Datos demográficos y clínicos de pacientes y controles en edad adulta.

Variable	MM	MZ	ZZ	ZZ-EPOC	EPOC	p-valor
n	15	9	6	5	5	
Edad (años)	42± 3,14	48± 8,09	25± 1,25	52± 3,18	57± 2,5	0,074
Hombre/Mujer	63,16%/36,84%	50%/50%	62,5%/37,5%	20%/80%	60%/40%	0,41
AAT (mg·dL ⁻¹)	211,1±55,1	81,8±16,54	26,8±7,734	21,95±5,96	107±6,86	<0,0001
IMC (kg·m ⁻²)	27,8±2,64	22,99±1,33	22,54±0,39	27,56±3,00	21,72±0,21	0,16
FEV ₁ %	99±4,83	102,3±10,53	100,4±3,59	43±9,82	38±9,00	0,0068
FVC %	97,2±2,98	113,3±4,18	98,96±4,67	77,5±13,33	103±93,5±9,5	0,079
FEV ₁ /FVC %	102±6,16	76,00±7,55	91,42±3,02	43,25±3,02	35,73±11,73	0,0002

RESULTADOS

AST (U·L ⁻¹)	24±1,78	23,40± 3,51	22± 2,19	27,75±3,66	12,00±1,53	0,29
ALT (U·L ⁻¹)	28±3,55	23,00± 4,56	24,60±2,46	31±8,18	9,000±6,12	0,29
GGT (U·L ⁻¹)	37±6,21	31,00± 15,52	19,8±2,67	23,5±9,5	23,00±7,48	0,76
Vitamina A	51,25±5,19	60±7,4	45,75±8,89	47±5,47	43,5±9,5	0,87
Vitamina D	21,78±2,94	29±7,77	36±5,56	27,25±11,06	24±7	0,28
Vitamina E	14,67±2,01	14,4±1,56	10,93±1,16	12,65±1,45	10,5±2,5	0,53

Los datos se expresan como media±SEM. Los resultados que mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) tras la aplicación del test ANOVA o Kruskal–Wallis, se han resaltado en **negrita**. La comparación de las proporciones se realizó mediante el test Chi-cuadrado. IMC: índice de masa corporal; FEV₁: Volumen espiratorio forzado en 1 segundo; FVC: capacidad vital forzada; AST: aspartato-aminotransferasa; ALT: alanina-aminotransferasa; GGT: γ -glutamyl-transferasa. AAT: rango normal 90-200 mg·dL⁻¹; FEV₁ y FVC: normal ≥ 80 % previsto; FEV₁/FVC%: normal > 80 % del valor teórico; AST y ALT: rango normal 1-40 U·L⁻¹; GGT: rango normal 1-55 U·L⁻¹; vitamina A: rango normal 20-60 μ g/dl; vitamina D rango normal; 20-50 ng/ml; vitamina E rango normal: 5,5-17 mg/l.

RESULTADOS

4.2. Pureza de los neutrófilos aislados

Tras el aislamiento de los neutrófilos se comprobó la pureza del cultivo mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo monoclonal anti CD16, que marca específicamente los neutrófilos y el anticuerpo anti CD45, que marca leucocitos totales. La muestra aislada mostraba una pureza de 96,94% de neutrófilos correspondientes con las células individuales positivas para CD16 (Figura 7).

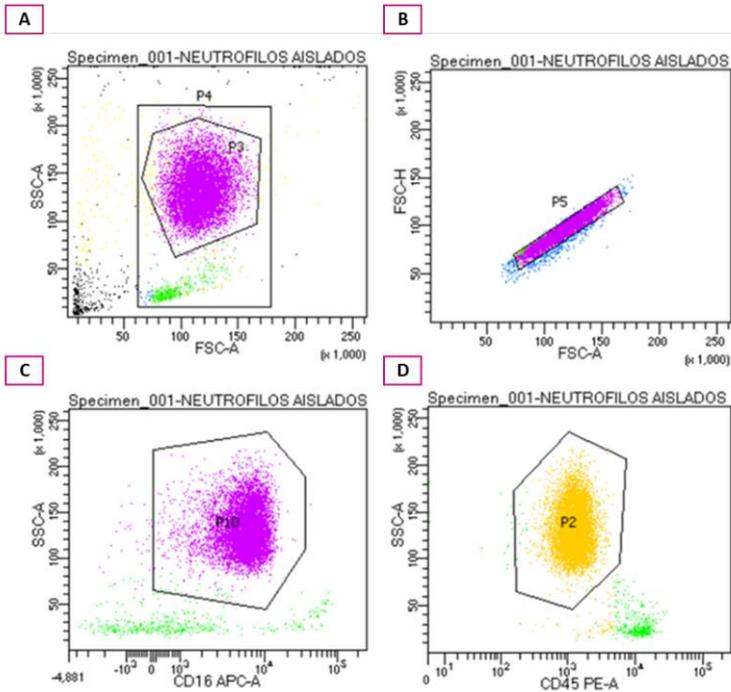


Figura 7. Pureza del cultivo de neutrófilos tras el aislamiento mediante selección inmunomagnética negativa determinado mediante citometría de flujo. A) Muestra los eventos totales en la muestra, B) exclusión de los agregados celulares, C) células presentes en la muestra marcadas con el anticuerpo anti CD16 conjugado con APC (marcador de neutrófilos), D) células presentes en la muestra marcadas con el anticuerpo anti CD45 conjugado con PE (marcador de leucocitos).

4.3. Viabilidad celular

Al cabo de las 4 horas de cultivo en las condiciones pertinentes, se determinó la viabilidad celular (apoptosis y necrosis) de los cultivos para descartar que las diferencias encontradas en el estudio pudieran deberse a la muerte celular.

Respecto al número de células vivas en los neutrófilos procedentes de pacientes con enfermedad pediátrica, incubados bajo condiciones de hipoxia, la media de los controles es 82,75%, mientras que la media en los grupos de pacientes MZ, SZ y ZZ es de 76,69, 79,80 y 75,86% respectivamente. Los análisis comparativos no mostraron diferencias significativas en cuanto al % de células vivas (Figura 8).

RESULTADOS

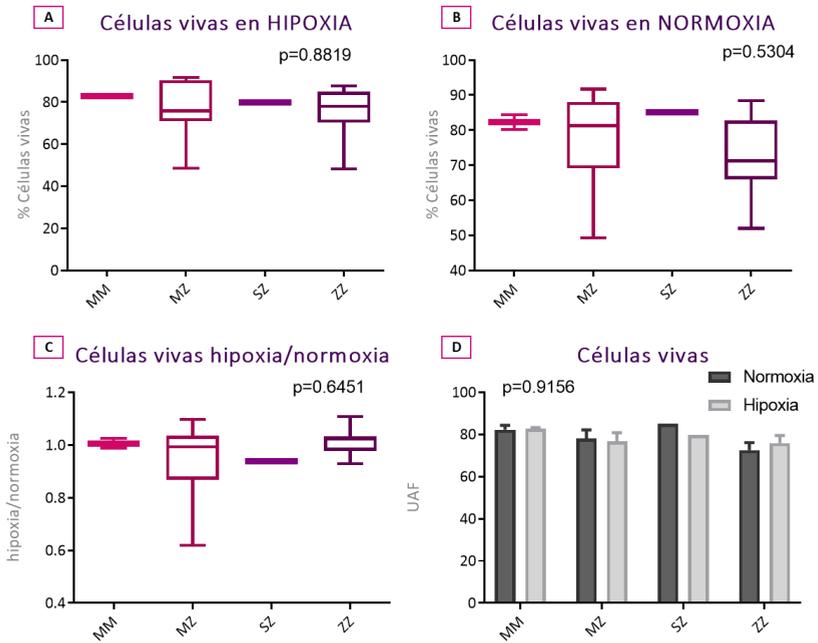


Figura 8. Células vivas en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica. % de neutrófilos vivos A) en condiciones de hipoxia B) en condiciones de normoxia C) cociente hipoxia frente a normoxia D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. * = $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

En referencia al número de células vivas en neutrófilos procedentes de adultos, la media de los controles sanos es 87,15% y en los controles MM con EPOC, de 69,75%, mientras que la media en los grupos de pacientes MZ y ZZ es de 87,04 y 64,17% respectivamente. Los análisis comparativos mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio en cuanto al % de células vivas cultivadas en hipoxia ($p=0,0075$), concretamente los neutrófilos de pacientes ZZ presentaron niveles significativamente disminuidos respecto a los MZ ($p=0,0279$) (Figura 9A). No se observaron diferencias entre los diferentes fenotipos bajo condiciones de normoxia ($p=0,2777$) (Figura 9B). En cuanto al cociente hipoxia/ normoxia, se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio ($p=0,0090$). Concretamente, se observó una disminución significativa entre los neutrófilos ZZ, los controles MM ($p=0,0451$), y los pacientes con EPOC ($p=0,0236$) (Figura 9C).

RESULTADOS

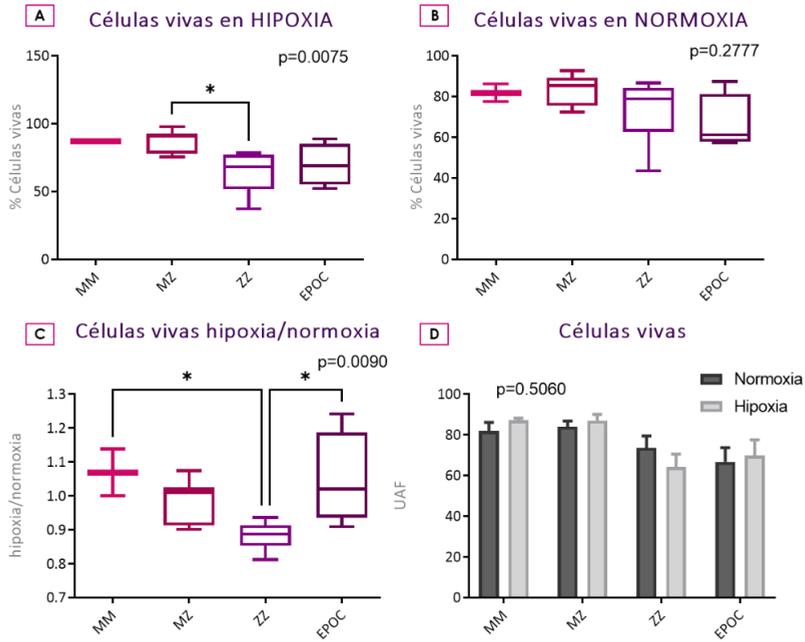


Figura 9. Células vivas en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta. % de neutrófilos vivos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Los análisis comparativos realizados según la presencia o ausencia de EPOC, no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 10).

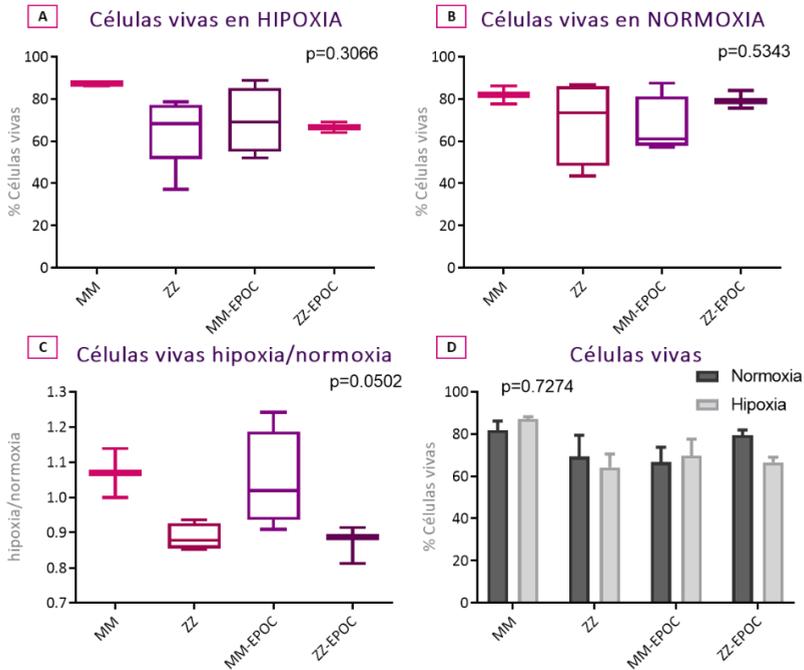


Figura 10. Células vivas en pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta. % de neutrófilos vivos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

4.4. Determinación de la degranulación de los neutrófilos procedentes de pacientes con DAAT

La degranulación de los neutrófilos se analizó mediante la detección de diversas proteínas en el medio de cultivo de los neutrófilos. Dichas células aisladas a partir de sangre total tanto de voluntarios sanos como de pacientes DAAT, fueron incubadas bajo condiciones de hipoxia (1% O₂) o normoxia (21% O₂) durante 4h a 37°C y estimulados con TNF- α (20ng/ml durante 30 minutos) y fMLP (100nM durante 10 minutos). Se determinó la liberación de AAT, proteína clave en la enfermedad de estudio, la cual está presente en los tres tipos de gránulos. La presencia de EN y MPO se utilizó como marcador de la liberación de los gránulos primarios o azurófilos, los niveles de lactoferrina se utilizaron como marcador de la liberación de gránulos secundarios o específicos y la MMP-9 como marcador de la liberación de los gránulos terciarios o de gelatinasa. En todos los casos estudiados la actividad o presencia de dichas proteínas se ha corregido frente a la concentración de proteína total para descartar posibles errores en el conteo de neutrófilos cultivados en cada condición.

RESULTADOS

4.4.1. Degranulación de los neutrófilos de pacientes y controles en la edad pediátrica

a) Liberación de AAT

Se determinó la cantidad de AAT en el medio de cultivo, al ser la proteína clave en la enfermedad de estudio. Como se esperaba los pacientes DAAT presentaban menor cantidad de AAT liberada en el sobrenadante, de acuerdo a su fenotipo, observándose diferencias estadísticamente significativas entre los neutrófilos procedentes de pacientes y del grupo control, tanto bajo condiciones de hipoxia ($p=0,0007$) como de normoxia ($p=5.433e-008$) (Figura 11A y 11B). Con respecto a la repercusión de la hipoxia sobre la liberación de AAT, se observa un efecto mayor en los neutrófilos ZZ que en los neutrófilos MM ($p=0,0203$) y MZ ($p=0,0062$), mientras que no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los neutrófilos de pacientes ZZ respecto a los SZ ($p=0,1584$) (Figura 11C). En cuanto a las diferencias entre las medias de hipoxia y normoxia de cada fenotipo no hubo significación estadística entre ellas ($p=0,9645$), a pesar de observarse un incremento bajo condiciones de hipoxia respecto a bajo normoxia en cada grupo de estudio (Figura 11D).

RESULTADOS

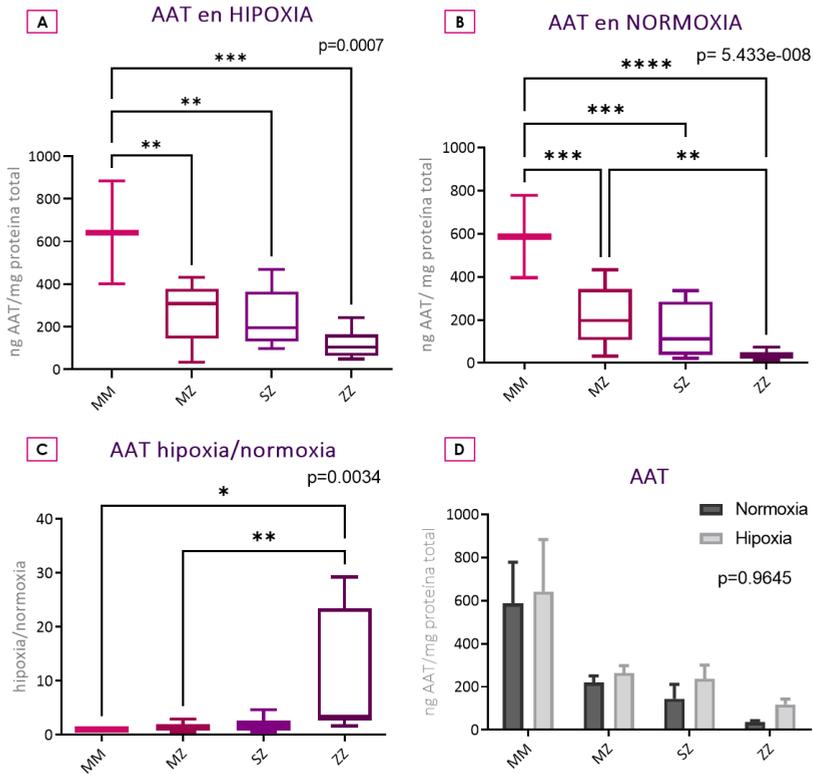


Figura 11. Niveles de AAT en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica. Determinación de la presencia de AAT en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

RESULTADOS

b) Liberación de los gránulos primarios

La liberación de los gránulos primarios se estudió mediante la determinación de la actividad EN en el sobrenadante del cultivo de los neutrófilos. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras procedentes de voluntarios sanos MM y las de pacientes con fenotipo ZZ ($p=0,0483$) bajo condiciones de hipoxia (Figura 12A). Sin embargo, bajo condiciones de normoxia, estas diferencias entre los fenotipos no existían ($p=0,4053$) (Figura 12B). Tampoco se encontró significación estadística al comparar el cociente de la actividad EN en condiciones de hipoxia frente a normoxia entre fenotipos ($p=0,1285$), a pesar de que durante la hipoxia se eleva en los pacientes con DAAT (Figura 12C). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias bajo condiciones de hipoxia frente a normoxia en cada grupo de estudio, no obstante, en todos los casos la actividad era mayor bajo condiciones de hipoxia (Figura12D).

RESULTADOS

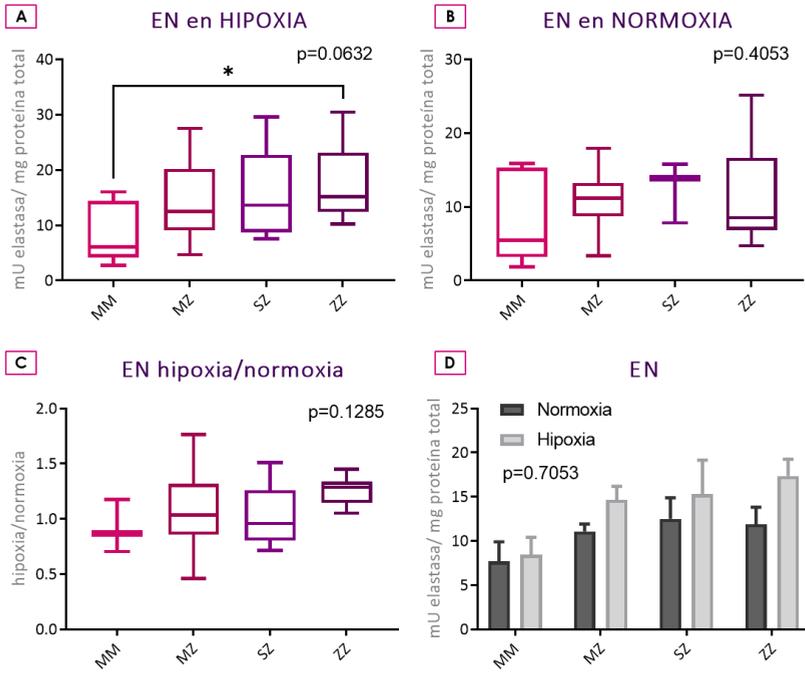


Figura 12. Actividad EN en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica. Determinación de la actividad EN en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. $*$ = $p<0.05$ $**$ = $p<0.01$, $***$ = $p<0.001$.

RESULTADOS

Para comprobar si la liberación era específica de la EN o de los gránulos primarios, se determinó también la presencia de MPO. Concretamente, se midió la actividad peroxidasa de la MPO en los sobrenadantes celulares. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre los fenotipos, en condiciones de hipoxia ($p=0,0402$) (Figura 13A), que en cambio no existían bajo condiciones de normoxia ($p=0,1762$) (Figura 13B). Bajo condiciones de hipoxia, los pacientes ZZ presentan valores incrementados de la actividad MPO respecto al grupo control ($p=0,0309$) (Figura 13A). Al comparar, en cada paciente el cociente de la actividad MPO bajo hipoxia y bajo normoxia, también se encontraron diferencias entre los diferentes fenotipos ($p=0,0115$), encontrando un incremento estadísticamente significativo en la *ratio* de la actividad en los pacientes ZZ frente a los voluntarios MM ($p=0,0076$) (Figura 13C). En el caso de los neutrófilos ZZ, también existen diferencias estadísticamente significativas en las medias de la actividad entre los cultivados en hipoxia y en normoxia ($p= 0,0116$) (Figura 13D).

RESULTADOS

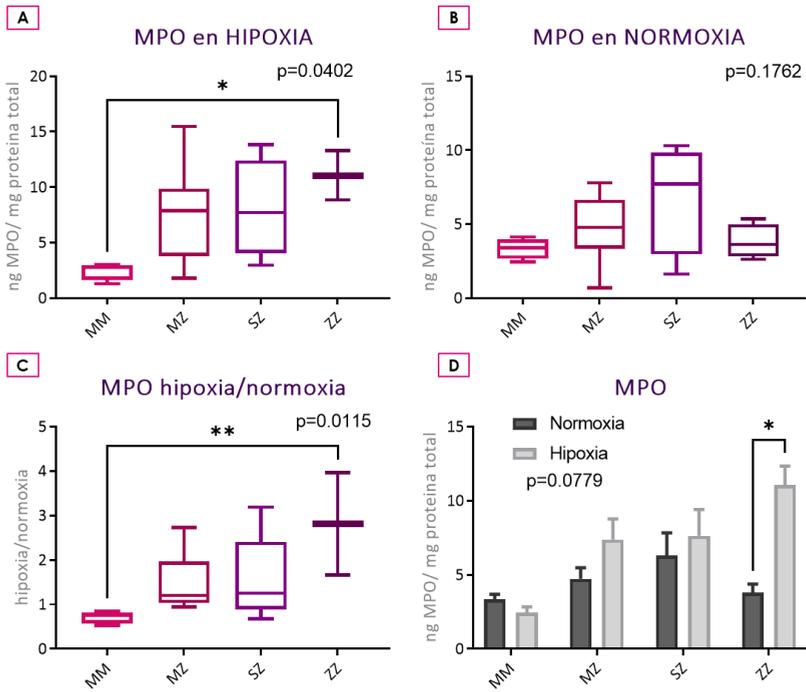


Figura 13. Actividad peroxidasa de la MPO en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica. Determinación de la actividad peroxidasa de la MPO en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Estos resultados muestran que, bajo condiciones de hipoxia, la liberación de los gránulos azurófilos es mayor en los pacientes DAAT, con una graduación acorde al riesgo fenotípico de desarrollar enfermedad, frente al grupo control. Por otro lado, se muestra que la hipoxia provoca en los neutrófilos de pacientes DAAT un aumento en la degranulación de dicho tipo de gránulo frente a la normoxia.

Para comprobar si estos efectos sobre la degranulación eran propios de los gránulos primarios o se extendían a los tres tipos de gránulos se estudiaron marcadores de los gránulos secundarios y terciarios de la misma manera.

c) Liberación de los gránulos secundarios

La proteína lactoferrina se encuentra ubicada principalmente en los gránulos secundarios por lo que sirvió como marcador de liberación de los mismos. Se determinó la cantidad de lactoferrina presente en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos bajo condiciones de hipoxia o normoxia.

Los resultados mostraron diferencias significativas entre los diferentes fenotipos en condiciones de hipoxia ($p=0,0044$) y de normoxia ($p= 0,0233$) (Figura 14A y B). Se observó un aumento estadísticamente significativo en la liberación de lactoferrina de los neutrófilos procedentes de pacientes ZZ frente a los pacientes MZ tanto en condiciones de hipoxia ($p=0,0040$) como de normoxia ($p=0,0192$) (Figura 14A y B). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio en cuanto al cociente

RESULTADOS

hipoxia/normoxia de los niveles de lactoferrina ($p=0,5415$) (Figura 14C), ni tampoco existieron en las comparaciones realizadas entre hipoxia y normoxia en cada grupo de estudio ($p=0,6117$), a pesar de que los neutrófilos de los pacientes ZZ, al incubarlos en hipoxia, tenían cantidades de lactoferrina incrementados frente a los que habían sido cultivados en normoxia (Figura 14D).

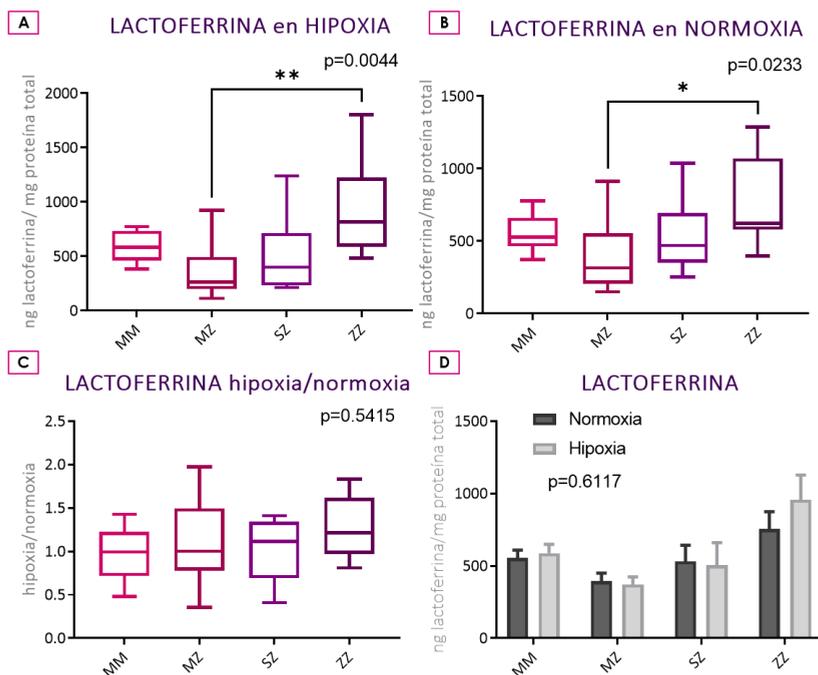


Figura 14. Niveles de lactoferrina en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica. Determinación de la presencia de lactoferrina en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

RESULTADOS

d) Liberación de los gránulos terciarios

La liberación de gránulos terciarios se evaluó mediante la presencia de la enzima MMP-9. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos fenotipos expuestos a hipoxia ($p=0,0013$) (Figura 15A), mientras que bajo condiciones de normoxia no hubo significación estadística ($p=0,3015$) (Figura 15B). Respecto a los pacientes MZ, los pacientes ZZ presentan un incremento estadísticamente significativo en presencia de MMP-9 ($p=0,0010$) y también frente a los controles MM ($p= 0,0444$) bajo condiciones de hipoxia (Figura 15A). En cuanto al cociente de MMP-9 liberada bajo condiciones de hipoxia frente a normoxia se observan, de la misma manera, diferencias entre los neutrófilos de los diferentes fenotipos ($p=0,0073$), siendo la concentración de dicha proteína mayor que en los pacientes ZZ que en los procedentes de pacientes MZ ($p=0,0084$) y SZ ($p=0,0451$) (Figura 15C). Respecto a los análisis comparativos entre las medias en hipoxia y normoxia dentro de cada grupo, a pesar de no llegar a alcanzar significación estadística ($p=0,0004$), en los pacientes SZ y ZZ se observa mayor cantidad de MMP-9 en los neutrófilos incubados bajo condiciones de hipoxia que de normoxia (Figura 15D).

RESULTADOS

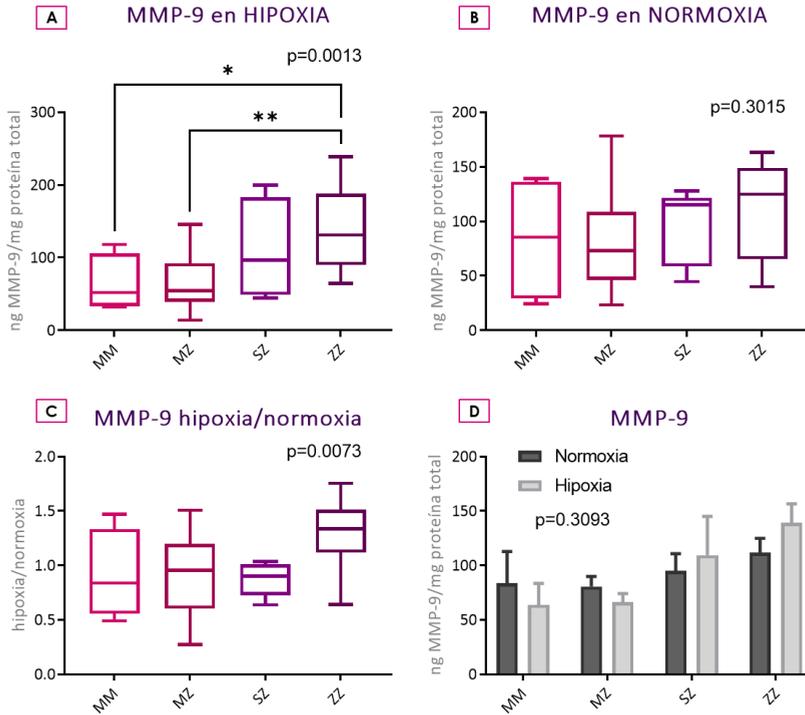


Figura 15. Niveles de MMP-9 en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica. Determinación de la presencia de MMP-9 en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. $*=p<0.05$ $**=p<0.01$, $***=p<0.001$.

RESULTADOS

4.4.2. Degranulación de los neutrófilos de pacientes y controles en edad adulta

a) Liberación de AAT

Respecto a la presencia de AAT en el medio de cultivo, según lo esperado, los pacientes DAAT presentaban menor cantidad de AAT liberada en el sobrenadante, de acuerdo a su fenotipo, que los voluntarios sanos, ($p=0,0265$), siendo la diferencia entre pacientes ZZ y controles sanos, significativa ($p=0,0260$) bajo condiciones de hipoxia (Figura 16^a). Asimismo, en los pacientes con DAAT la cantidad de AAT liberada en el sobrenadante, era menor de acuerdo a su fenotipo ($p=0,0052$), siendo la diferencia entre pacientes ZZ y controles sanos significativa ($p=0,0046$) también bajo condiciones de normoxia (Figura 16B). Con respecto al cociente en la liberación de AAT en hipoxia frente a normoxia, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los fenotipos ($p=0,0322$) (Figura 16C). Sin embargo, estas diferencias no existían entre las medias de hipoxia y normoxia dentro de cada fenotipo ($p=0,9905$), a pesar de que, en cada uno de los grupos de estudio, se observó que, bajo condiciones de hipoxia, existía un ligero incremento sobre las de normoxia (Figura 16D).

RESULTADOS

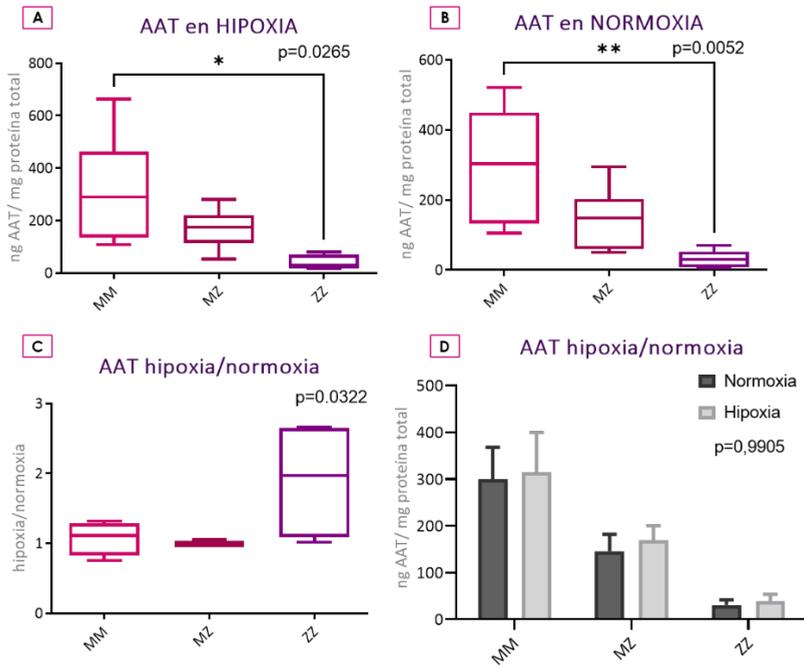


Figura 16. Niveles de AAT en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta. Determinación de la presencia de AAT en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

RESULTADOS

En referencia al efecto de la terapia de reposición, las comparaciones entre el momento previo y 5 días después de iniciar el tratamiento mostraron, como era de esperar, un aumento significativo de la AAT medida tanto bajo condiciones de hipoxia ($p=0,0152$) como de normoxia ($p=0,0146$) (Figura 17A y B). No se encontraron diferencias significativas en el cociente hipoxia y normoxia ($p=0,4972$) (Figura 17C). Sin embargo, lo más interesante es que se observa, de nuevo, un aumento en la liberación de AAT bajo condiciones de hipoxia en comparación a los niveles encontrados bajo condiciones de normoxia, aunque sin llegar a alcanzar significación estadística ($p=0,2564$) (Figura 17D).

RESULTADOS

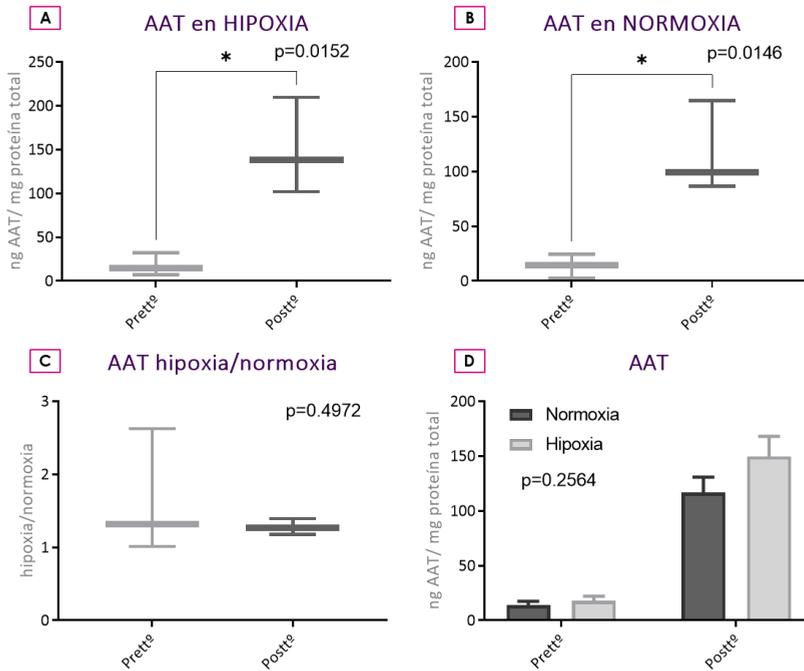


Figura 17. Niveles de AAT en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de AAT en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos de pacientes ZZ antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. $*=p<0.05$ $**=p<0.01$, $***=p<0.001$.

RESULTADOS

b) Liberación de los gránulos primarios

Para el caso de los adultos, de misma manera que en niños, la liberación de los gránulos primarios se estudió mediante la determinación de la actividad EN en el sobrenadante del cultivo de los neutrófilos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de los diferentes fenotipos ni bajo condiciones de hipoxia ($p=0,5646$), ni de normoxia ($p=0,2583$) (Figura 18A y B). Sin embargo, la actividad EN en los sobrenadantes ZZ es ligeramente mayor que en el resto de grupos de estudio en condiciones de hipoxia (Figura 18A). Asimismo, a pesar de que las diferencias en el cociente de actividad EN en hipoxia y normoxia tampoco alcanzaron significación estadística ($p=0,1225$), se observa un ligero aumento en los pacientes ZZ con EPOC (Figura 18C). De igual manera, si examinamos la gráfica que muestra la media de dicha actividad en hipoxia y normoxia, se aprecia que tanto en pacientes MZ como ZZ y MM-EPOC la actividad es mayor en hipoxia que en normoxia, a pesar de no ser datos estadísticamente significativos ($p=0,9118$) (Figura 18D).

RESULTADOS

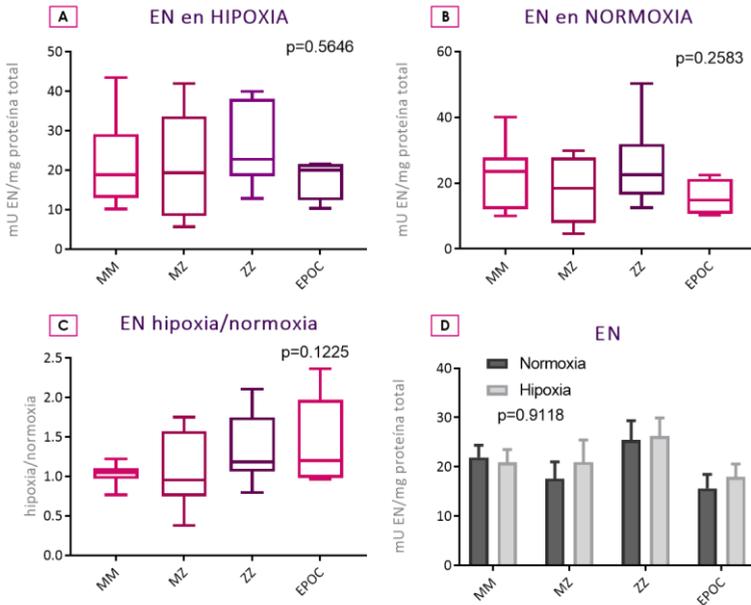


Figura 18. Actividad elastasa en los pacientes DAAT y en los controles en edad adulta. Determinación de la actividad elastasa en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

Cabe destacar que el grupo de estudio de los pacientes ZZ incluye tanto a los que presentan una EPOC, como a los que tienen una función pulmonar normal. Por este motivo, con el objetivo de tratar de reducir el impacto de factores de confusión respecto a la variabilidad clínica de los pacientes adultos, se realizaron análisis comparativos de los diferentes parámetros, en este caso de la actividad elastasa, teniendo en cuenta la presencia, o no, de EPOC en los sujetos. Se compararon sujetos con EPOC no asociada al DAAT y pacientes ZZ con y sin EPOC frente a los controles sanos. Aunque tampoco se logró alcanzar la significación estadística en estas

RESULTADOS

comparaciones, la actividad EN en los neutrófilos de los pacientes ZZ parece estar aumentada (Figura 19A y B). Asimismo, los individuos MM-EPOC, ZZ sin EPOC y ZZ-EPOC presentan un cociente hipoxia/normoxia ligeramente aumentado respecto a los controles MM ($p=0,0561$) (Figura 19C), lo que concuerda con el hecho de que la actividad elastasa en cada uno de estos grupos, sea mayor bajo condiciones de hipoxia que bajo condiciones de normoxia ($p=0,7229$) (aunque sin llegar a ser estadísticamente significativos). (Figura 19D).

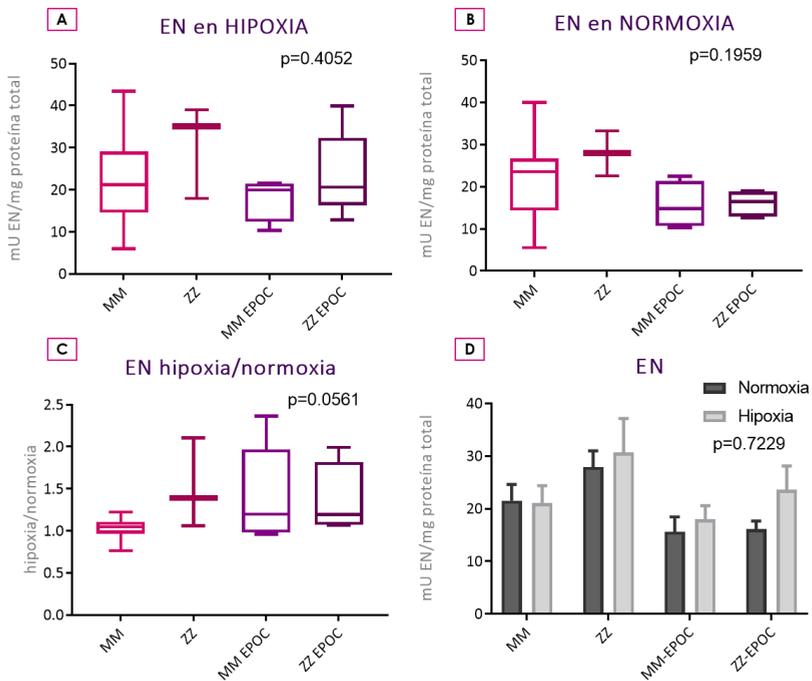


Figura 19. Actividad EN en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta. Determinación de la actividad elastasa en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos a) en condiciones de hipoxia, b) en condiciones de normoxia, c) cociente hipoxia frente a normoxia, d) representación de las medias en hipoxia y normoxia. $*=p<0.05$ $**=p<0.01$, $***=p<0.001$.

RESULTADOS

Por otro lado, se analizaron las posibles diferencias en la degradación de los pacientes ZZ previamente a la administración de la terapia de reposición y a los 5 días después de iniciar el tratamiento. Aunque no se observaron cambios significativos, tanto en el momento previo como posterior al tratamiento se observa mayor actividad EN en condiciones de hipoxia que de normoxia (Figura 20D).

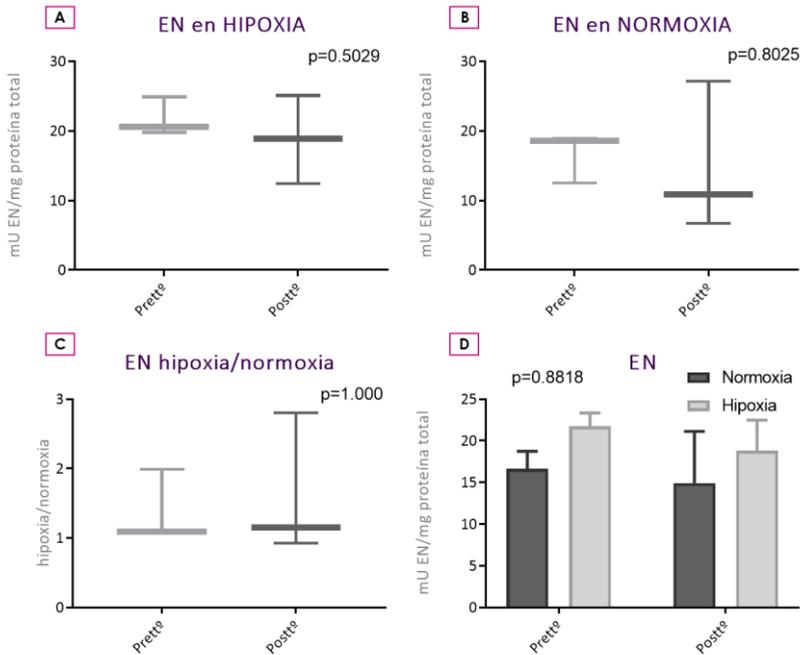


Figura 20. Determinación de la actividad EN en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la actividad EN en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos de pacientes ZZ antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. * $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Asimismo, se evaluó la actividad peroxidasa de la MPO en los sobrenadantes celulares. Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los fenotipos ($p=0,0003$) bajo condiciones de hipoxia (Figura 21A). En esas condiciones los pacientes ZZ y los pacientes EPOC no asociada al DAAT presentan valores incrementados de la actividad MPO respecto al grupo control ($p=0,0006$ y $p=0,0025$, respectivamente) (Figura 21A). De la misma manera, se observaron diferencias significativas entre los fenotipos, bajo condiciones de normoxia ($p=1.667e-005$) (Figura 21B). No obstante, respecto al cociente entre los valores, bajo hipoxia y normoxia, los análisis comparativos no mostraron diferencias significativas entre los fenotipos (Figura 21C), así como tampoco se encontraron diferencias entre las medias, en hipoxia y normoxia, dentro de cada grupo (Figura 21D).

RESULTADOS

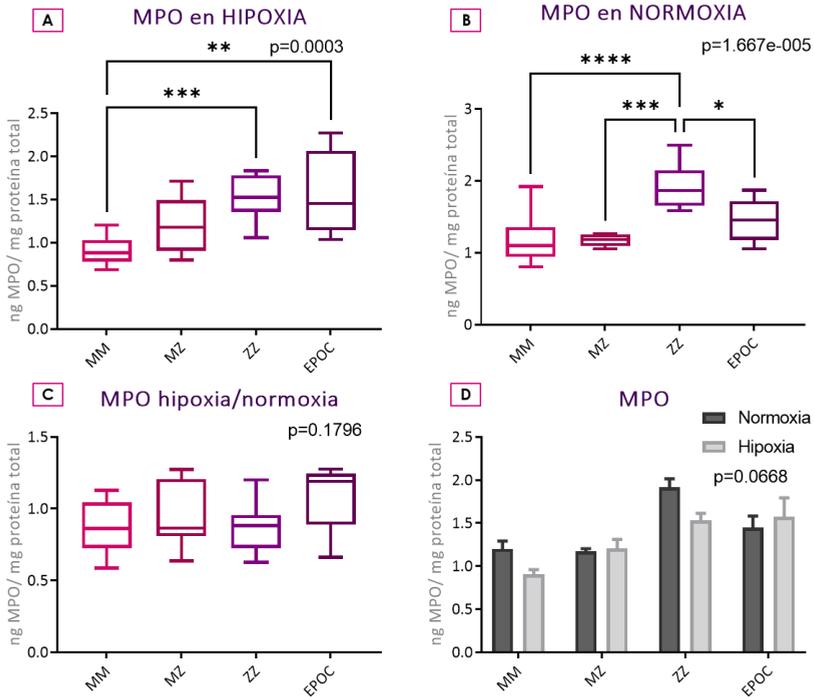


Figura 21. Actividad peroxidasa de la MPO en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta. Determinación de la actividad peroxidasa de la MPO en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Respecto a la comparación entre los pacientes ZZ y los controles según la presencia o ausencia de EPOC, se encontraron diferencias significativas, bajo condiciones de hipoxia, entre pacientes y controles sanos MM ($p=0,0011$), tanto en el caso de los sujetos con EPOC no asociada al DAAT ($p=0,0044$) como en los pacientes ZZ con EPOC ($p=0,0029$) (Figura 22A). Estas mismas diferencias significativas entre los mismos grupos ($p=0,0388$) se dieron también, bajo condiciones de normoxia ((Figura 22B). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas ni en cuanto al cociente entre fenotipos ($p=0,1671$) ni en la comparación de las medias de hipoxia y normoxia en cada grupo ($p=0,3694$) (Figura 22C y D).

RESULTADOS

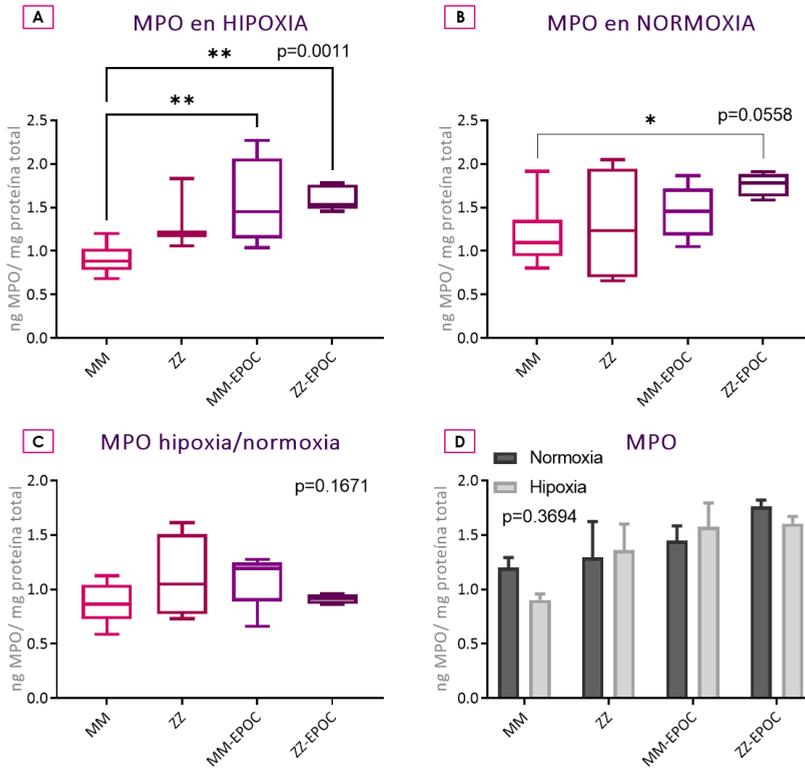


Figura 22. Actividad peroxidasa de la MPO en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta. Determinación de la actividad peroxidasa de la MPO en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

En cuanto a los análisis comparativos respecto a la terapia de reposición no se observaron cambios significativos en ninguno de los análisis comparativos realizados respecto a la liberación de MPO (Figura 23).

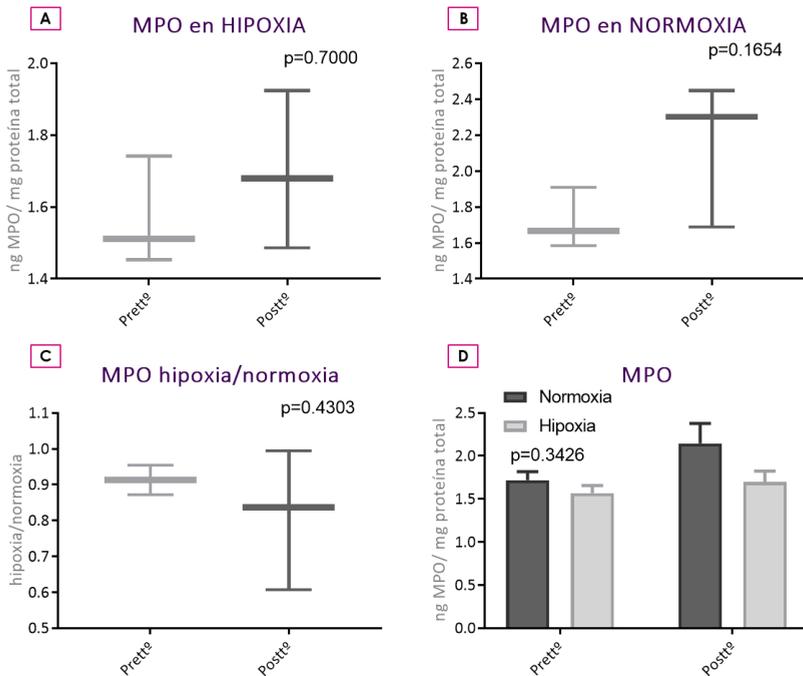


Figura 23. Determinación de la actividad peroxidasa de la MPO en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la actividad peroxidasa de la MPO en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos de pacientes ZZ antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Para comprobar si estos efectos en la degranulación eran propios de los gránulos primarios o se extendían a los tres tipos de gránulos se estudiaron los marcadores de los gránulos secundarios y terciarios en los neutrófilos procedentes de adultos, de la misma manera que se hizo en los niños.

RESULTADOS

c) Liberación de los gránulos secundarios

La proteína lactoferrina, utilizada como marcador de la liberación de los gránulos secundarios, no mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio en los análisis comparativos realizados bajo condiciones de hipoxia ($p=0,5365$) o de normoxia ($p=0,2421$) (Figura 24A y B). Tampoco se observaron diferencias significativas en el cociente entre hipoxia y normoxia entre los fenotipos ($p=0,4089$) (Figura 24C). Por otro lado, a pesar de que las comparaciones entre las medias de las cantidades de lactoferrina no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre hipoxia y normoxia ($p=0,4093$), se observa un ligero incremento de lactoferrina liberada bajo condiciones de hipoxia frente a la liberada bajo condiciones de normoxia en los pacientes MZ y ZZ (Figura 24D).

RESULTADOS

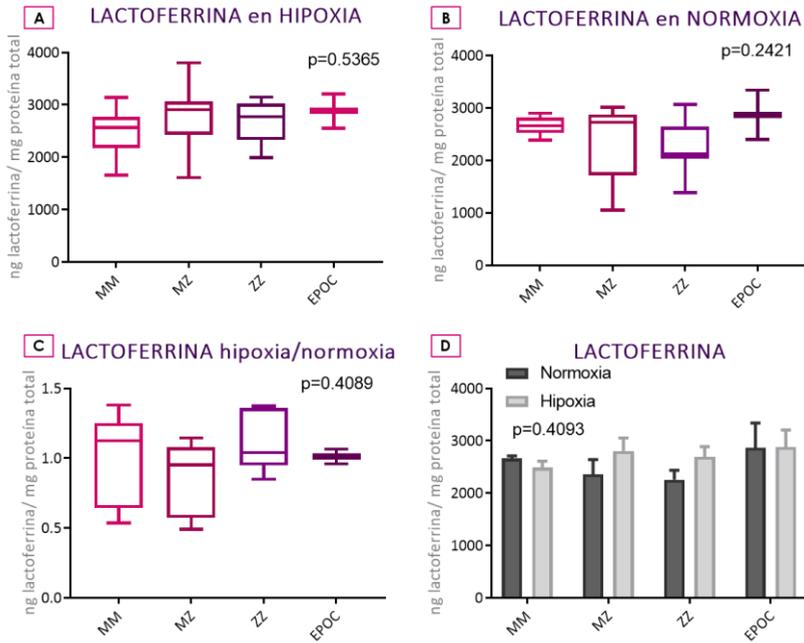


Figura 24. Niveles de lactoferrina en los pacientes con DAAT en edad adulta. Determinación de la presencia de lactoferrina en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio al comparar los pacientes ZZ con los controles según, la presencia o ausencia de EPOC, ni en las preparaciones incubadas bajo condiciones de hipoxia ($p=0,6142$), ni de normoxia ($p=0,1121$) (Figura 25A y B). Tampoco se apreciaron estas diferencias en cuanto los cocientes hipoxia/normoxia ($p=0,4089$) entre los grupos de estudio (Figura 25C). Por otro lado, la cantidad de lactoferrina liberada bajo condiciones de hipoxia es mayor que la obtenida bajo condiciones de normoxia en los pacientes ZZ, tanto en los que sufren EPOC como en los que no la presentan, aunque las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas ($p=0,1899$). (Figura 25D).

RESULTADOS

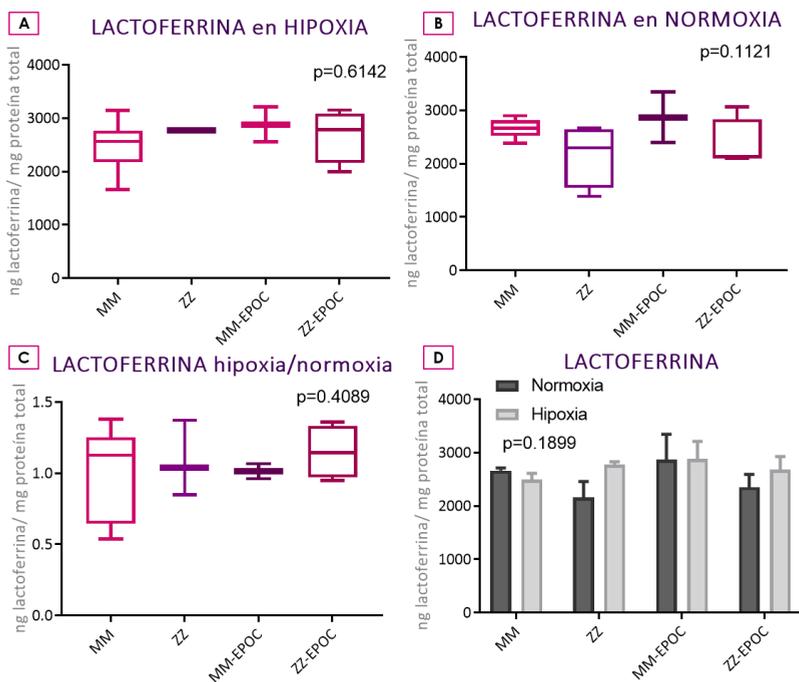


Figura 25. Niveles de lactoferrina en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en controles en edad adulta. Determinación de la presencia de lactoferrina en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

En cuanto a los análisis comparativos respecto a la terapia de reposición tampoco se encontraron diferencias significativas (Figura 26). Sin embargo, cabe destacar que como en los casos de gránulos previos, también se observa un ligero aumento en la liberación de lactoferrina bajo condiciones de hipoxia respecto a normoxia tanto en el momento previo a la administración del tratamiento como a los 5 días del inicio del mismo (Figura 26D).

RESULTADOS

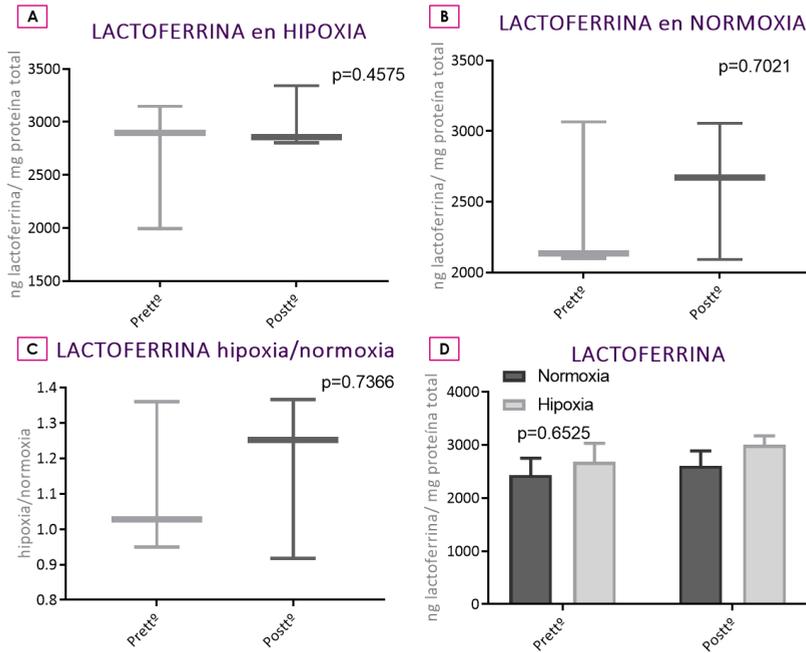


Figura 26. Determinación de la presencia de lactoferrina en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de lactoferrina en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos de pacientes ZZ antes y a los 5 días de la administración del tratamiento a) en condiciones de hipoxia, b) en condiciones de normoxia, c) cociente hipoxia frente a normoxia, d) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

d) Liberación de los gránulos terciarios

La liberación de gránulos terciarios se determinó mediante la presencia de la enzima MMP-9 en los cultivos celulares. Se observaron diferencias significativas entre el grupo MM-EPOC respecto al resto de grupos de estudio, bajo condiciones de hipoxia ($p=0,0029$) (Figura 27A); concretamente los valores de los neutrófilos de los MM-EPOC se vieron incrementados frente a los controles MM sanos ($p=0,0016$), los pacientes MZ ($p=0,0085$) y los pacientes ZZ ($p=0,0294$), aunque las diferencias entre los fenotipos no fueron estadísticamente significativas bajo condiciones de normoxia ($p=0,1608$) (Figura 27B). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el cociente hipoxia frente a normoxia ($p=0,6263$), como tampoco se encontraron diferencias entre las medias de cada grupo en ambas condiciones ($p=0,9315$) (Figura 27C y D).

RESULTADOS

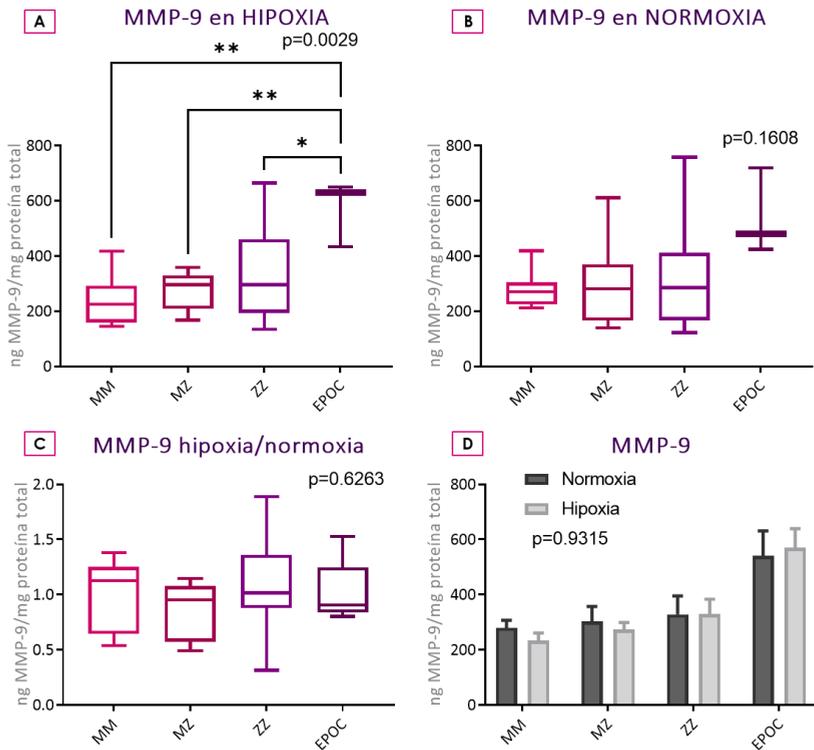


Figura 27. Niveles de MMP-9 en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta. Determinación de la presencia de MMP-9 en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Respecto a la comparación entre los pacientes ZZ y los controles, según la presencia o ausencia de EPOC, se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con EPOC no asociada al DAAT respecto a los controles sanos MM ($p=0,0004$), los ZZ sin EPOC ($p=0,0053$) y los ZZ con EPOC ($p=0,0127$) bajo condiciones de hipoxia ($p=0,0199$) (Figura 28A). Estas diferencias significativas también se observaron en la liberación de MMP-9 bajo condiciones de normoxia ($p=0,0339$) (Figura 28B). Sin embargo, los análisis comparativos en cuanto al cociente entre condiciones de hipoxia y normoxia, no fueron significativos entre los grupos de estudio ($p=0,1842$) (Figura 28C). Tampoco se encontraron diferencias significativas en cuanto a las medias bajo condiciones de hipoxia y normoxia dentro de cada grupo ($p=0,5974$) aunque, se observa un ligero incremento en los pacientes ZZ con y sin EPOC y los MM con EPOC (Figura 28D).

RESULTADOS

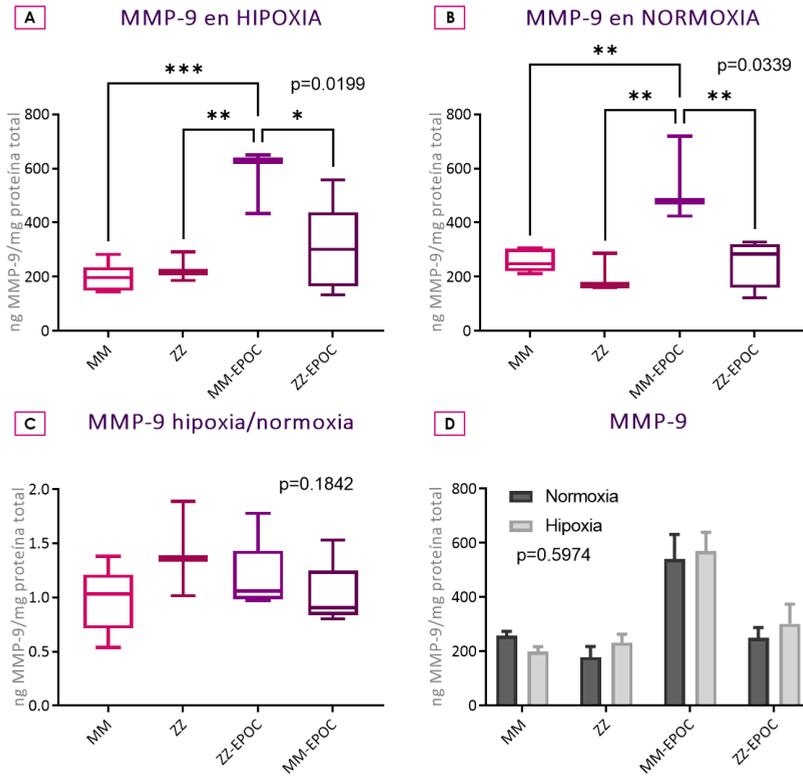


Figura 28. Niveles de MMP-9 en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta. Determinación de la presencia de MMP-9 en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$

RESULTADOS

Respecto a la administración de tratamiento aumentativo en los pacientes ZZ, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los análisis comparativos realizados (Figura 29).

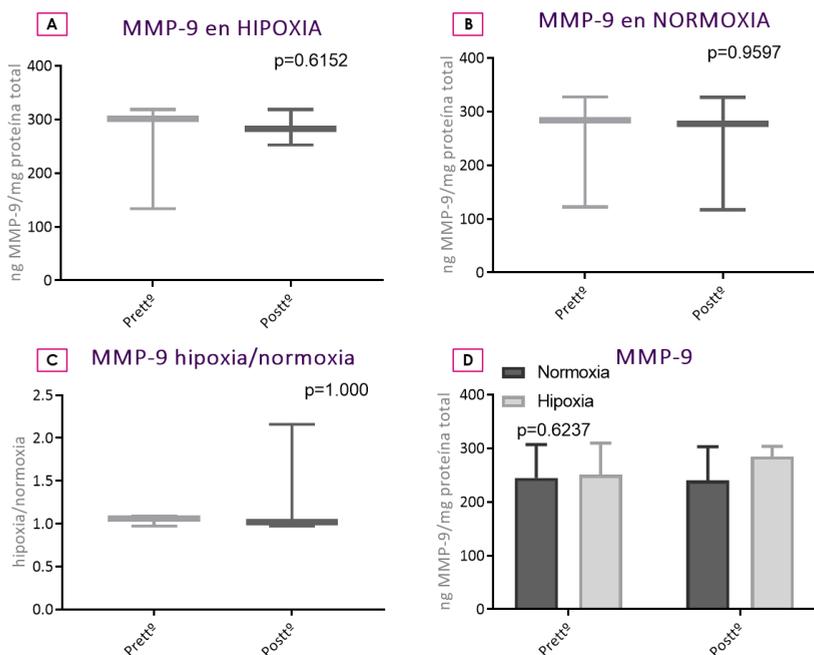


Figura 29. Niveles de MMP-9 en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de MMP-9 en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos de pacientes ZZ antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

4.5. Determinación de la producción y secreción de citoquinas por los neutrófilos procedentes de pacientes con DAAT

La producción y secreción de dos citoquinas proinflamatorias, IL-8 y TNF- α , se determinó en el sobrenadante del cultivo de los neutrófilos procedentes de pacientes DAAT e individuos sanos, durante 4h, a 37°C, y estimulados con TNF- α (20ng/ml, durante 30 minutos) y fMLP (100nM, durante 10 minutos), tanto bajo condiciones de hipoxia (1% O₂) como de normoxia (21% O₂). Igualmente que, en el caso de la degranulación, la presencia de cada citoquina se corrigió frente a la concentración de proteína total, para descartar posibles errores en el conteo de neutrófilos cultivados en cada condición.

RESULTADOS

4.5.1. Producción y secreción de citoquinas en la edad pediátrica

Los análisis comparativos entre fenotipos mostraron diferencias significativas tanto bajo condiciones de hipoxia ($p=0,0192$) como de normoxia ($p=0,0091$) (Figura 30A y B). En condiciones de hipoxia, los neutrófilos procedentes de pacientes ZZ mostraron niveles significativamente elevados de IL-8 respecto a los pacientes MZ ($p=0,0177$) (Figura 30A), mientras que bajo condiciones de normoxia, los pacientes ZZ incrementaron significativamente esos niveles frente a los SZ ($p=0,0177$), MZ ($p=0,0275$) y controles MM ($p=0,0456$) (Figura 30A). No se encontraron diferencias significativas en cuanto al cociente hipoxia/normoxia (Figura 30C). Por el contrario, existen diferencias significativas entre la liberación de IL-8 en los incubados bajo hipoxia respecto a los niveles liberados bajo normoxia, tanto en neutrófilos ZZ ($p= 0,0001$) como SZ ($p= 0,0370$) (Figura 30D).

RESULTADOS

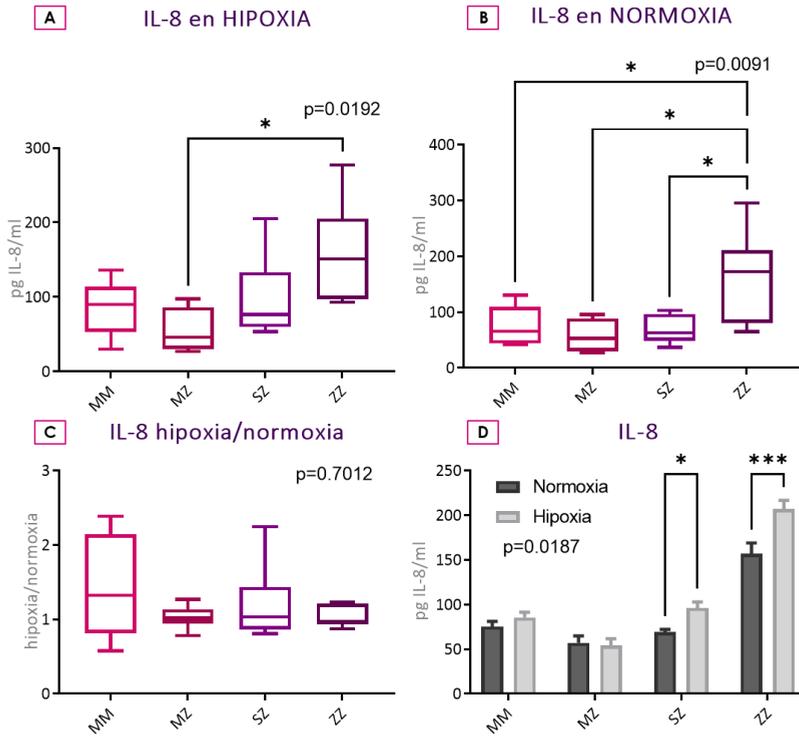


Figura 30. Niveles de IL-8 en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica. Determinación de la presencia de IL-8 en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

RESULTADOS

4.5.1. Producción y secreción de citoquinas en la edad adulta

No se observaron diferencias significativas en la liberación de IL-8 entre los neutrófilos aislados de voluntarios sanos MM y de los pacientes ZZ de edad adulta (Figura 31), ni bajo condiciones de hipoxia ($p=0,7302$) (Figura 31A) ni de normoxia ($p=0,6422$) (Figura 31B). Tampoco llegan a ser estadísticamente significativas las diferencias entre fenotipos, en cuanto al cociente hipoxia frente a normoxia ($p=0,5556$) (Figura 31C), ni entre la liberación de IL-8 en las condiciones de hipoxia frente a normoxia, en cada grupo ($p=0,8276$); no obstante, se observa un ligero aumento en la liberación bajo hipoxia frente a normoxia, tanto en los controles MM como en los pacientes ZZ (Figura 31D).

RESULTADOS

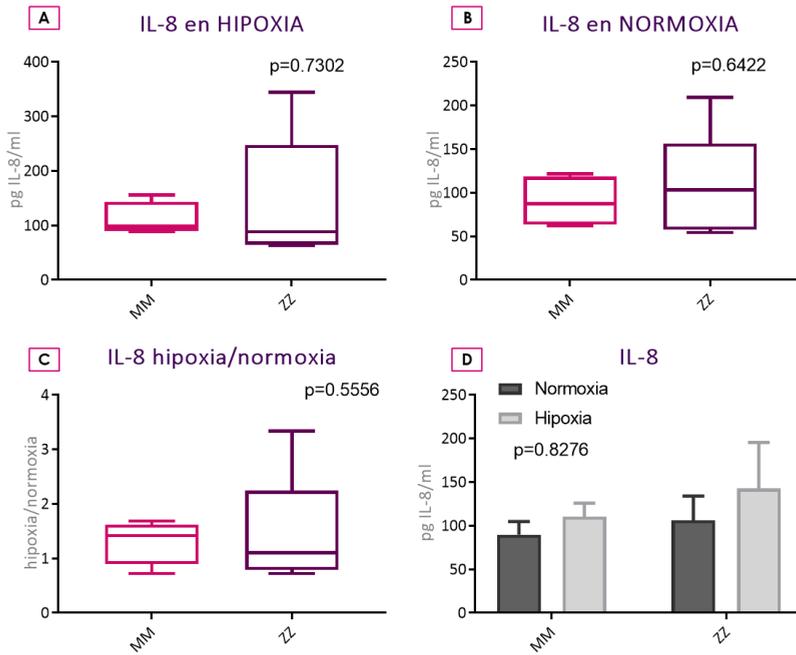


Figura 31. Niveles de IL-8 en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta. Determinación de la presencia de IL-8 en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Los niveles de TNF- α mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio tanto bajo condiciones de hipoxia ($p=9,225e-005$) como de normoxia ($p=0,0010$) (Figura 32A y B). Bajo condiciones de hipoxia, se observa un aumento significativo en la liberación de TNF- α en los neutrófilos de pacientes ZZ respecto a los MZ ($p= 0,0085$) y controles MM ($0,0025$), así como en la liberación de esta citoquina por los neutrófilos MM-EPOC comparados con los de los pacientes MZ ($p=0,0020$) y los de los controles MM ($p=0,0005$) (Figura 32A). Por otro lado, bajo condiciones de normoxia únicamente se encontraron diferencias significativas entre el grupo MM-EPOC respecto a los pacientes MZ ($p=0,0027$) y los controles MM ($p=0,0022$) (Figura 32B). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en el cociente hipoxia/normoxia entre fenotipos (Figura 32C). Finalmente, la secreción de TNF- α bajo condiciones de hipoxia fue mayor que bajo condiciones de normoxia en los grupos de estudio MM, MZ, ZZ y MM-EPOC, aunque no llegaron a alcanzar significación estadística ($p= 0,9133$) (Figura 32D).

RESULTADOS

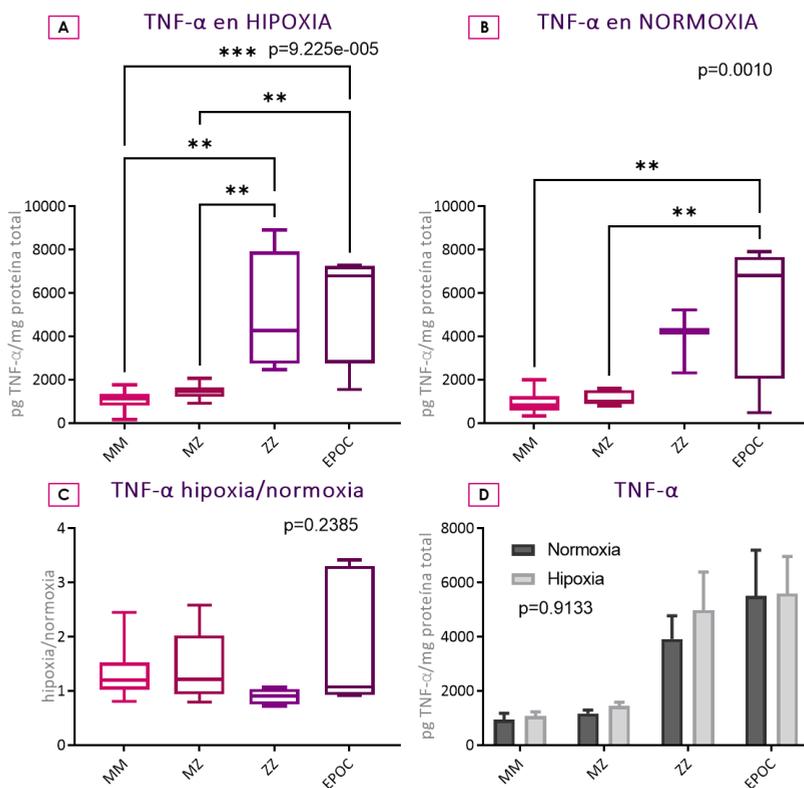


Figura 32. Niveles de TNF- α en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta. Determinación de la concentración de TNF- α presente en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

En cuanto a los análisis comparativos respecto a la terapia de reposición no se encontraron diferencias significativas en la liberación de TNF- α por los neutrófilos de los pacientes ZZ en tratamiento (Figura 33).

RESULTADOS

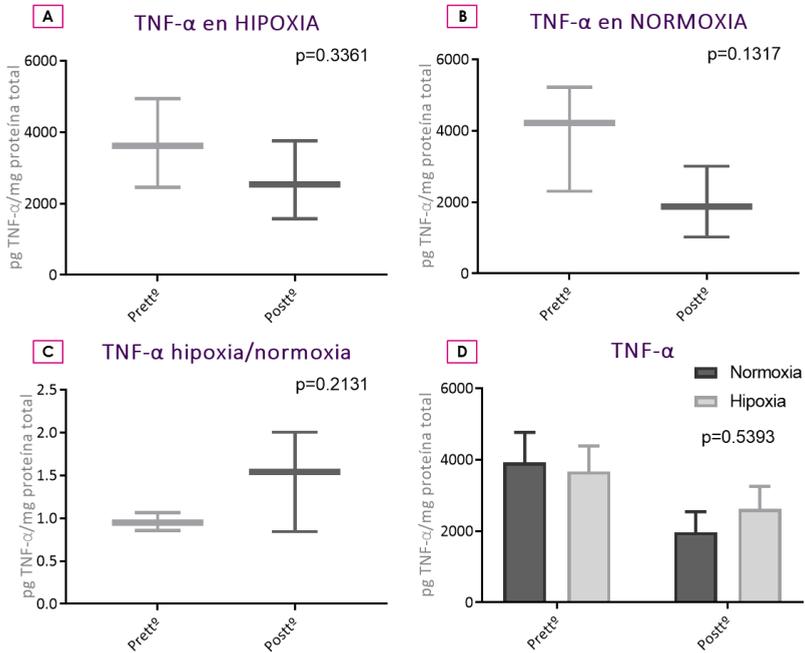


Figura 33. Niveles de TNF- α en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de TNF- α en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos de pacientes ZZ antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. $*=p<0.05$ $**=p<0.01$, $***=p<0.001$.

4.6. Determinación del calcio intracelular en neutrófilos procedentes de pacientes DAAT

Tras el aislamiento de neutrófilos procedentes de niños con DAAT y de voluntarios sanos, y la incubación pertinente en condiciones de hipoxia (1% O₂) o normoxia (21% O₂), durante 4h a 37°C, estas células fueron estimuladas con TNF- α y activadas con fMLP. Tras ello, se procedió a la detección de Ca²⁺ intracelular mediante citometría de flujo.

4.6.1. Determinación del calcio intracelular la edad pediátrica

Respecto a los niveles de Ca²⁺ intracelular, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes fenotipos, ni en el caso de neutrófilos incubados en condiciones de hipoxia ($p=0,2024$) (Figura 34A), ni en los incubados bajo condiciones de normoxia ($p=0,1894$) (Figura 34B). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el cociente hipoxia/normoxia (Figura 34C). Cabe destacar que, en todos los grupos de estudio (excepto los SZ), la media del Ca²⁺ intracelular bajo condiciones de hipoxia, es mayor que bajo condiciones de normoxia, aunque no llega a alcanzar significancia estadística ($p=0,67754$). (Figura 34D).

RESULTADOS

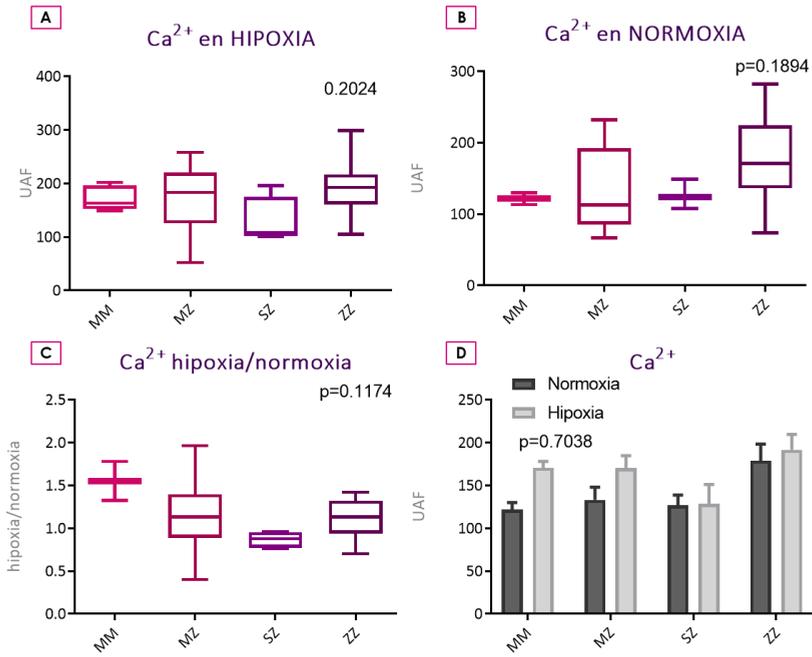


Figura 34. Niveles de Ca^{2+} intracelular en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica. Ca^{2+} intracelular, medido a través de la fluorescencia emitida por Fluo-4, en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

4.6.2. Determinación del calcio intracelular en edad adulta

No se observaron diferencias significativas en los niveles de Ca^{2+} intracelular en los neutrófilos de los diferentes grupos incubados bajo condiciones de hipoxia (Figura 35).

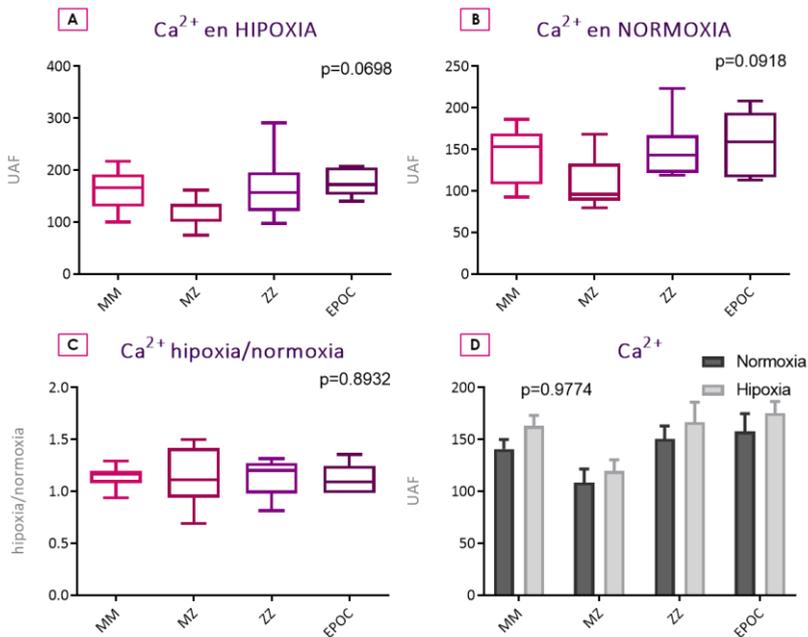


Figura 35. Niveles de Ca^{2+} intracelular en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta. Ca^{2+} intracelular, medido a través de la fluorescencia emitida por Fluo-4, en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Tampoco se encontraron diferencias en los niveles de Ca^{2+} intracelular, en los análisis comparativos de los controles y de los pacientes ZZ en presencia y ausencia de EPOC (Figura 36).

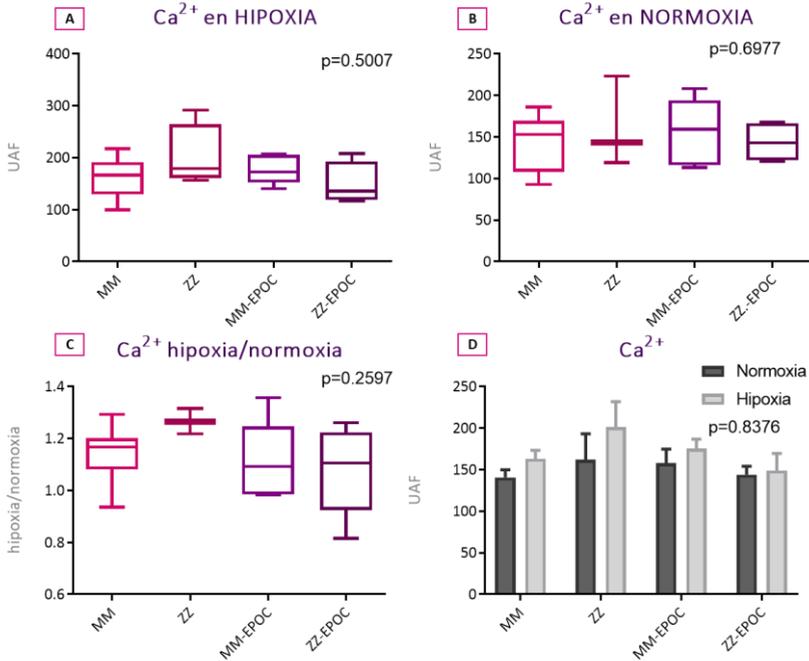


Figura 36. Niveles de Ca^{2+} intracelular en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta. Determinación del Ca^{2+} intracelular en cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Respecto a los cambios en Ca^{2+} intracelular provocados por la terapia de reposición, los análisis comparativos, antes del tratamiento y a los 5 días de su administración, no mostraron diferencias estadísticamente significativas bajo condiciones de hipoxia ($p=0,2789$) (Figura 37A), pero sí bajo condiciones de normoxia ($p=0,03914$) (Figura 37B). No se encontraron diferencias significativas en cuanto al cociente hipoxia/normoxia ($p=0,7802$) (Figura 37C), ni en cuanto a las medias en cada grupo ($p=0,9903$) (Figura 37D). Sin embargo, cabe destacar que, bajo condiciones de hipoxia, tanto previa como posteriormente al tratamiento, los valores de Ca^{2+} eran ligeramente superiores a los mismos medidos bajo condiciones de normoxia (Figura 37D).

RESULTADOS

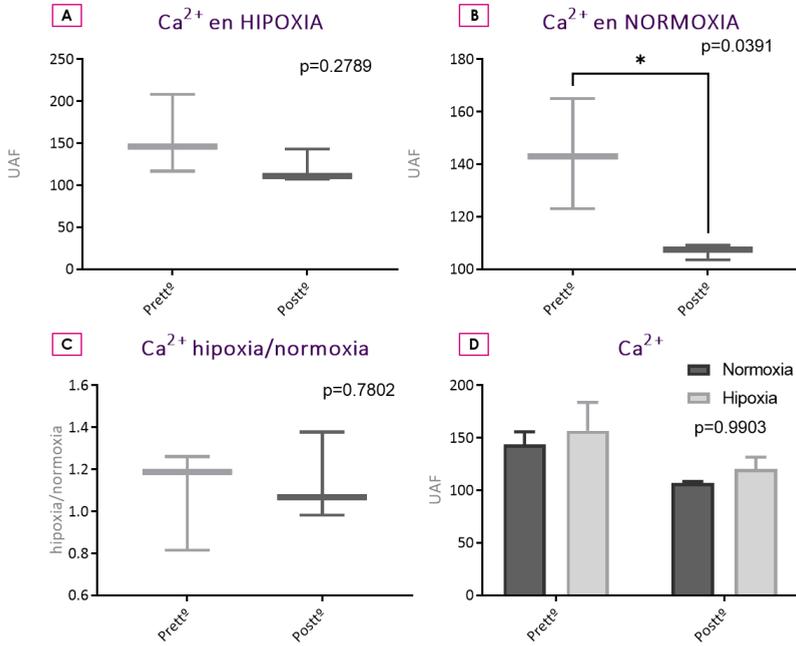


Figura 37. Niveles de Ca^{2+} intracelular en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación del Ca^{2+} intracelular en cultivos de neutrófilos de pacientes ZZ antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

4.7. Determinación del perfil oxidativo de los neutrófilos procedentes de pacientes con DAAT

Los neutrófilos procedentes de niños con DAAT y de voluntarios sanos se incubaron a 37°C en condiciones de hipoxia (1% O₂) o normoxia (21% O₂) durante 4h. Posteriormente, fueron estimulados con TNF- α y activados con fMLP. Tras ello, se procedió a la detección de ROS y de RNS intracelulares, de la función mitocondrial y del daño oxidativo en las biomoléculas mediante citometría de flujo.

4.7.1. Perfil oxidativo en la edad pediátrica

a) Producción de especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS)

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=2.168e-005$), bajo condiciones de hipoxia, entre los niveles de ONOO⁻ de los neutrófilos en los diferentes fenotipos. Las pruebas de análisis múltiple mostraron que los pacientes ZZ presentan niveles significativamente incrementados de ONOO⁻ respecto a los pacientes MZ ($p=0,0002$) y a los del grupo control ($p=3,097e-005$) (Figura 38A). Igualmente, se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio bajo condiciones de normoxia ($p=0,0230$) (Figura 38B). Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre fenotipos en la *ratio* hipoxia/ normoxia ($p=0,1061$), ni tampoco en la comparación entre hipoxia y normoxia, dentro de cada grupo

RESULTADOS

($p=0,9009$), se observa un pequeño aumento en la *ratio* de los neutrófilos ZZ respecto al resto de fenotipos (Figura 38C), así como también una mayor producción de ONOO^- en hipoxia que en normoxia, en el grupo ZZ (Figura 38D).

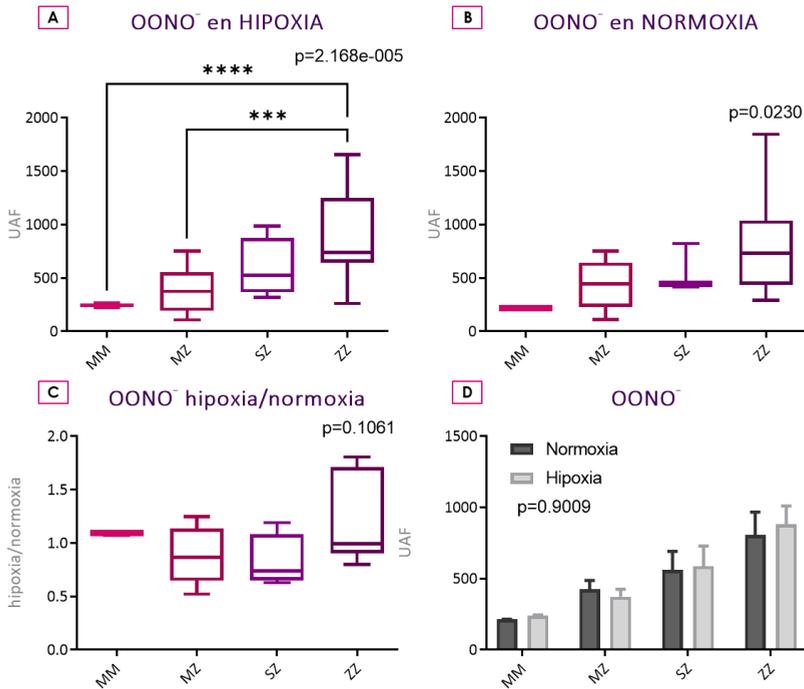


Figura 38. Niveles de ONOO^- en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica. ONOO^- intracelulares medidos a través de la fluorescencia emitida por DHR-123, en cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

RESULTADOS

Con respecto a los niveles de H_2O_2 en los neutrófilos, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0027$), entre los diferentes fenotipos bajo condiciones de hipoxia. Las pruebas de análisis múltiple mostraron que los pacientes ZZ presentan niveles significativamente aumentados de H_2O_2 respecto a los pacientes MZ ($p=0,0030$) y a los controles MM ($p=0,0310$) (Figura 39A). El análisis comparativo entre los fenotipos según el cociente entre hipoxia y normoxia, no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,6362$) (Figura 39C). Por el contrario, los neutrófilos ZZ incubados en condiciones de hipoxia, muestran mayor producción de H_2O_2 comparados con los ZZ incubados en condiciones de normoxia ($p=0,0178$) (Figura 39D).

RESULTADOS

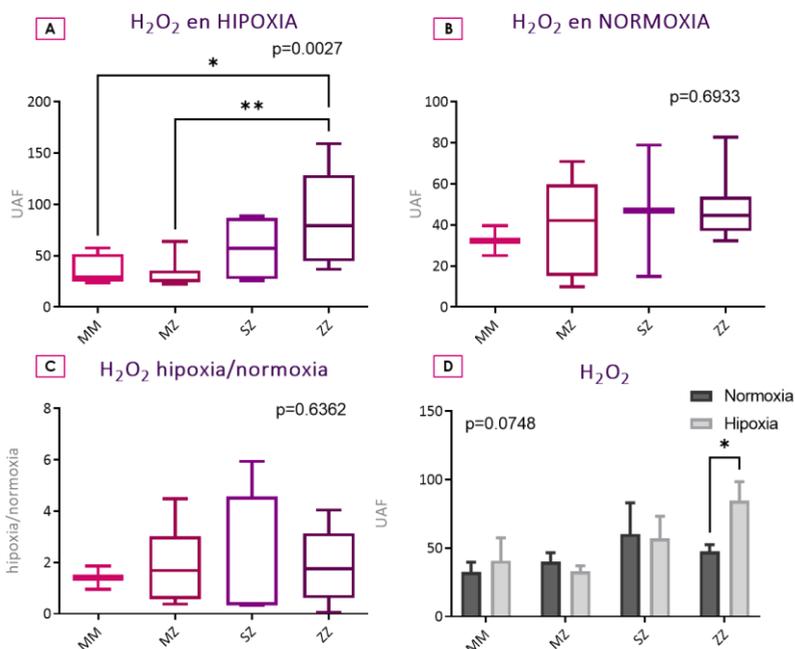


Figura 39. Niveles de H₂O₂ en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica. H₂O₂ intracelulares medidos a través de la fluorescencia emitida por DCFH₂DA, en cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Respecto a la producción de anión O_2^- bajo condiciones de hipoxia, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0025$), aunque, en este caso, se observa una reducción en los pacientes MZ ($p=0,0194$) y SZ ($p=0,0046$) respecto al grupo control MM (Figura 40A). También existían diferencias significativas entre los fenotipos bajo condiciones de normoxia ($p=0,0261$) (Figura 40B) que, en cambio, no se observaron cuando se comparó el cociente entre los niveles -bajo hipoxia y normoxia- ($p=0,0261$) (Figura 40C). Cuando esta comparación se hizo entre las medias de los neutrófilos incubados bajo hipoxia o bajo normoxia, en cada grupo de estudio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,4047$) (Figura 40D).

RESULTADOS

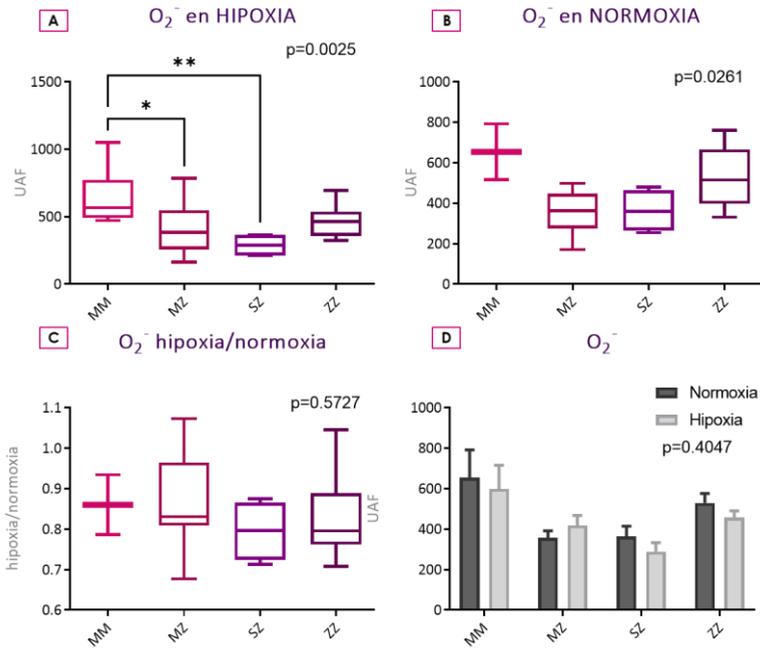


Figura 40. Niveles del anión O_2^- en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica. O_2^- intracelular medido a través de la fluorescencia emitida por DAF-FM, en cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. $*=p<0.05$ $**=p<0.01$, $***=p<0.001$.

RESULTADOS

b) Producción de especies reactivas derivadas del nitrógeno (RNS)

Por lo que respecta a la producción de NO, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio, bajo condiciones de hipoxia ($p=0,0161$). En esta situación, los pacientes ZZ presentaron niveles significativamente incrementados de NO comparados con los pacientes MZ ($p=0,0301$) (Figura 41A), mientras que -bajo condiciones de normoxia ($p=0,2022$) (Figura 41B) y en cuanto a las comparaciones del cociente entre los niveles en hipoxia y los de normoxia-, no se observaron diferencias ni entre los fenotipos ($p=0,6375$) (Figura 41C), ni entre los niveles de NO -en condiciones de hipoxia y normoxia- dentro de cada grupo de estudio ($p=0,9481$) (Figura 41D).

RESULTADOS

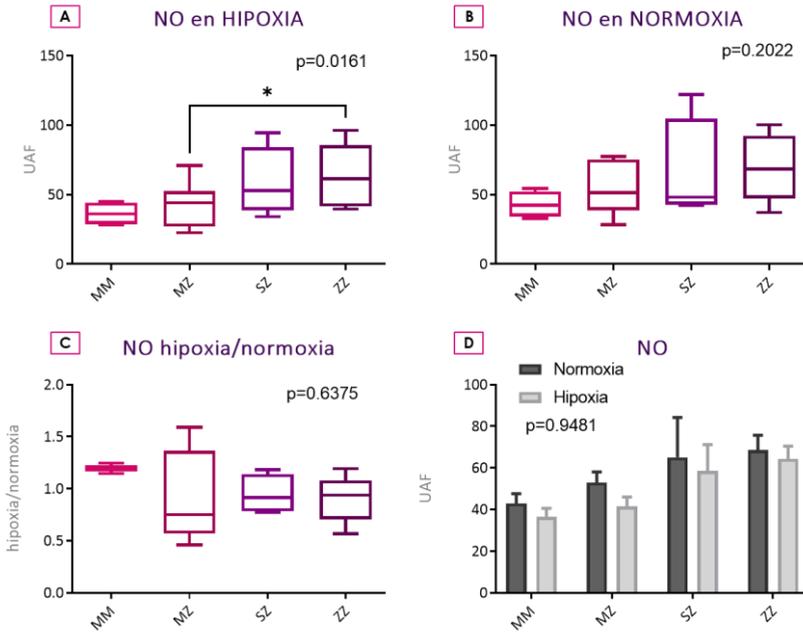


Figura 41. Niveles de NO en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica. NO intracelular medido a través de la fluorescencia emitida por DAF-FM, en cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

c) Función mitocondrial

En cuanto a los niveles de O_2^- mitocondrial no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes fenotipos, ni en el caso de los neutrófilos incubados en condiciones de hipoxia, ni en el caso de la hipoxia normalizada frente la normoxia. Tampoco se encontraron diferencias entre la hipoxia y normoxia en cada grupo de estudio ($p=0,7969$) (Figura 42).

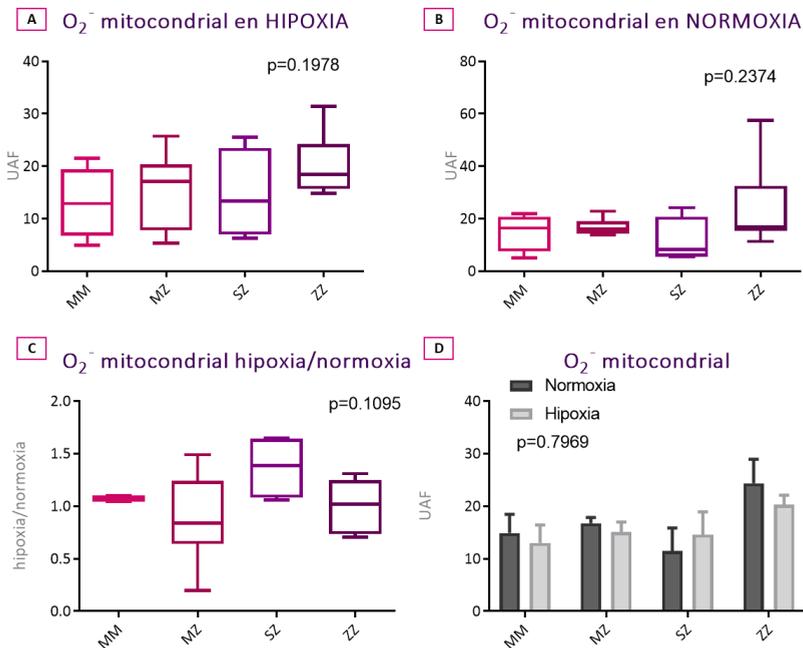


Figura 42. Niveles de O_2^- mitocondrial en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica. O_2^- mitocondrial medido a través de la fluorescencia emitida por MitoSOX, en cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

RESULTADOS

Respecto al $\Delta\Psi_m$ se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los neutrófilos MZ en comparación con los controles sanos ($p=0,0066$) incubados en condiciones de hipoxia (Figura 43A). Por el contrario, no se observaron diferencias en el resto de las comparaciones realizadas, ni en el caso de la hipoxia normalizada frente la normoxia. (Figura 43)

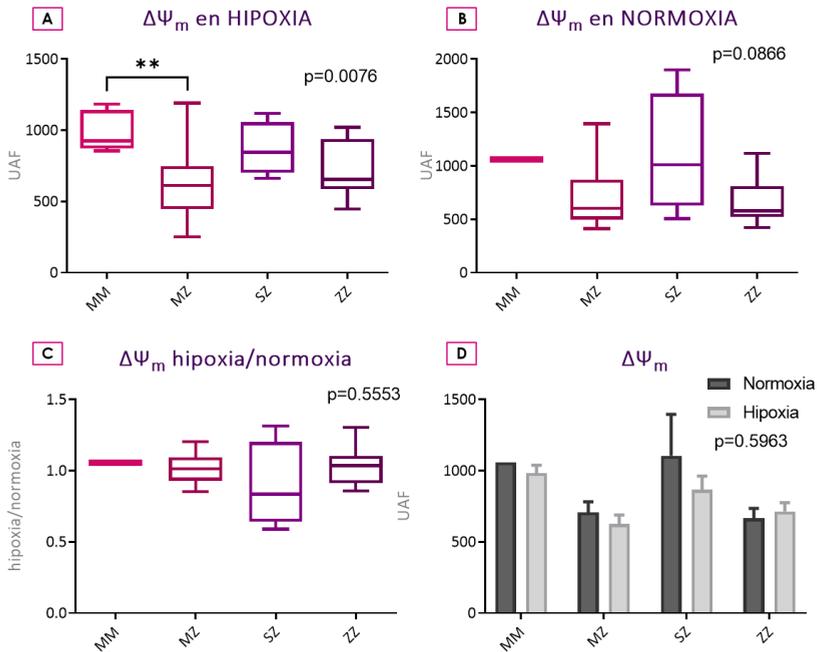


Figura 43. Potencial de membrana mitocondrial en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica. $\Delta\Psi_m$ medido a través de la fluorescencia emitida por TMRM, en cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. $*$ = $p<0.05$ $**$ = $p<0.01$, $***$ = $p<0.001$.

RESULTADOS

d) Daño oxidativo en las biomoléculas

Los resultados en cuanto a los niveles de proteínas carboniladas indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes fenotipos bajo condiciones de hipoxia ($p=0,047$). Las pruebas de análisis múltiple mostraron que tanto los pacientes ZZ como los SZ y MZ, presentan niveles significativamente incrementados de proteínas carboniladas respecto al grupo control ($p=0,0057$, $p=0,0239$ y $p=0,0198$ respectivamente) (Figura 44A). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los fenotipos, en los niveles de proteínas carboniladas bajo condiciones de normoxia ($p=0,2032$) (Figura 44B), ni respecto al cociente hipoxia/normoxia ($p=0,6004$) (Figura 44C). Tampoco se detectaron al comparar las medias de los niveles de proteínas carboniladas bajo hipoxia y bajo normoxia, en cada grupo analizado ($p=0,9033$) (Figura 44D).

RESULTADOS

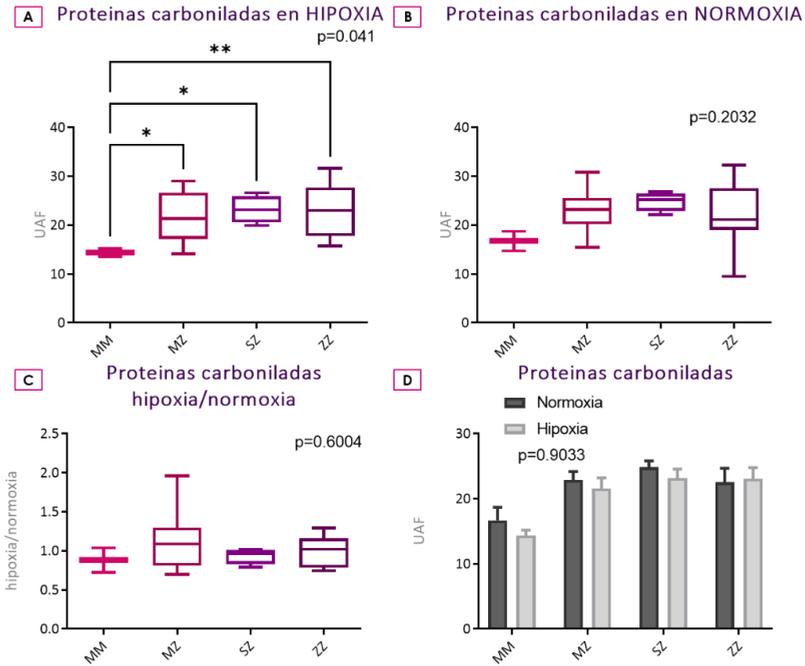


Figura 44. Niveles de proteínas carboniladas en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica. Proteínas carboniladas medidas a través de la fluorescencia emitida por FTC, en cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

RESULTADOS

En referencia a la peroxidación lipídica, los pacientes ZZ mostraron valores aumentados de lípidos peroxidados, en comparación con los controles bajo condiciones de hipoxia ($p=0,0283$) (Figura 45A). Por el contrario, no se observaron diferencias entre los fenotipos bajo condiciones de normoxia ($p=0,3846$) (Figura 45B), ni tampoco entre los fenotipos, en cuanto al cociente de los lípidos peroxidados en hipoxia/normoxia ($p=0,9337$) (Figura 45C), o al comparar cada grupo en situación de hipoxia y normoxia ($p=0,9193$) (Figura 45D).

RESULTADOS

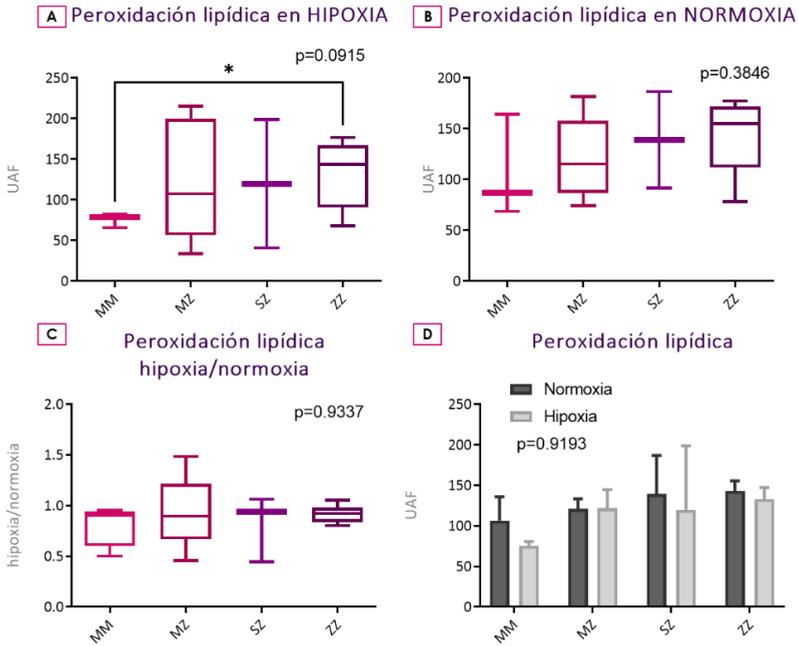


Figura 45. Niveles de lípidos peroxidados en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica. Peroxidación lipídica medida a través de la fluorescencia emitida por BODIPY, en cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. $*$ = $p<0.05$ $**$ = $p<0.01$, $***$ = $p<0.001$.

RESULTADOS

4.7.2. Perfil oxidativo en la edad adulta

a) Producción de especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS)

Respecto a los resultados en la producción de ROS, no se encontraron diferencias, en los grupos de estudio, ni respecto a los niveles de ONOO^- bajo condiciones de hipoxia ($p=0,594$) y de normoxia ($p=0,6972$), ni tampoco respecto al cociente entre hipoxia/normoxia ($p=0,3577$) (Figura 46A, B y C). Sin embargo, se puede observar que los niveles de ONOO^- en los pacientes ZZ, es mayor que en los controles MM, tanto en hipoxia como de normoxia (Figura 46A y B). No existen diferencias estadísticas al comparar las situaciones de hipoxia y normoxia, dentro de cada grupo ($p=0,9808$) (Figura 46D).

RESULTADOS

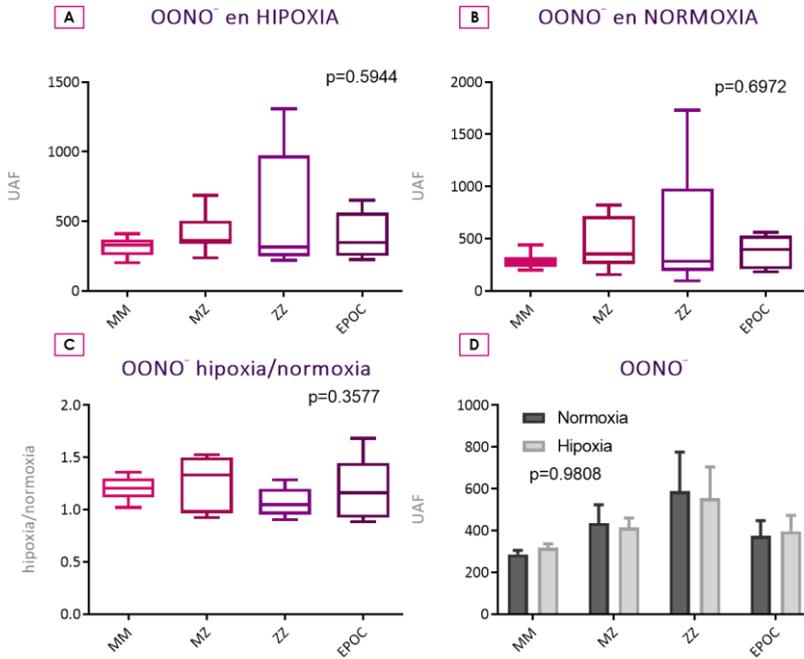


Figura 46. Niveles de ONOO⁻ en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta. ONOO⁻ intracelulares medidos a través de la fluorescencia emitida por DHR-123, en cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

En referencia a los análisis de los niveles de ONOO^- en los pacientes ZZ con mayor riesgo de desarrollar enfermedad respecto a los controles con o sin EPOC, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 47).

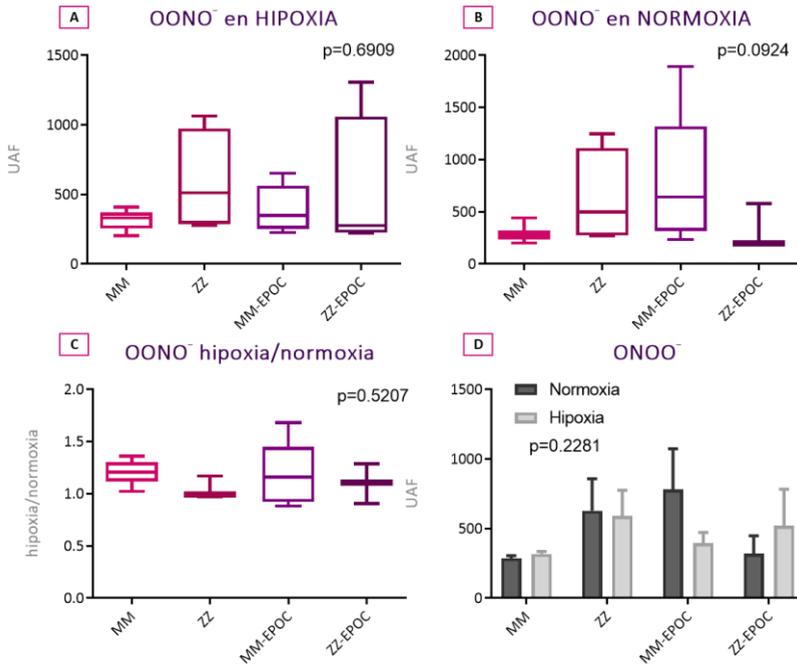


Figura 47. Niveles de ONOO^- en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta. ONOO^- intracelulares medidos a través de la fluorescencia emitida por DHR-123, en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

RESULTADOS

En cuanto a los análisis comparativos respecto a la terapia de reposición no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la producción de ONOO^- (Figura 48). No obstante, se observa un ligero descenso en ONOO^- a los 5 días de tratamiento (Figura 48A y B).

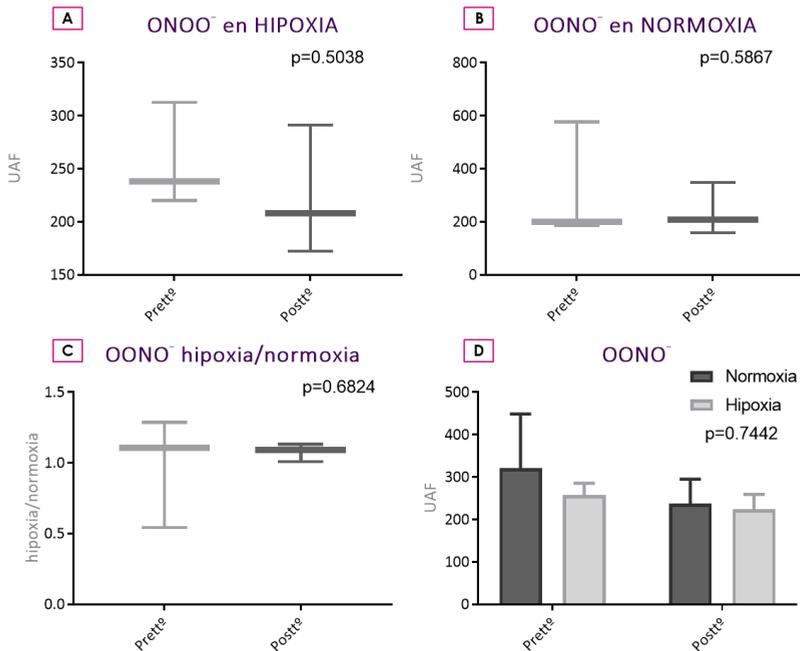


Figura 48. Niveles de ONOO^- en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de ONOO^- en neutrófilos de los pacientes ZZ, antes y 5 días después de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

RESULTADOS

Respecto al H_2O_2 , no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones analizadas (Figura 49). Sin embargo, cabe destacar un incremento en H_2O_2 en los neutrófilos ZZ respecto a los controles, tanto en hipoxia como en normoxia, aunque las diferencias no lleguen a ser estadísticamente significativas (Figura 49A y B). Asimismo, la producción de este hidroperóxido bajo hipoxia, es ligeramente mayor que bajo normoxia tanto en los pacientes ZZ, como en los MZ (Figura 49D).

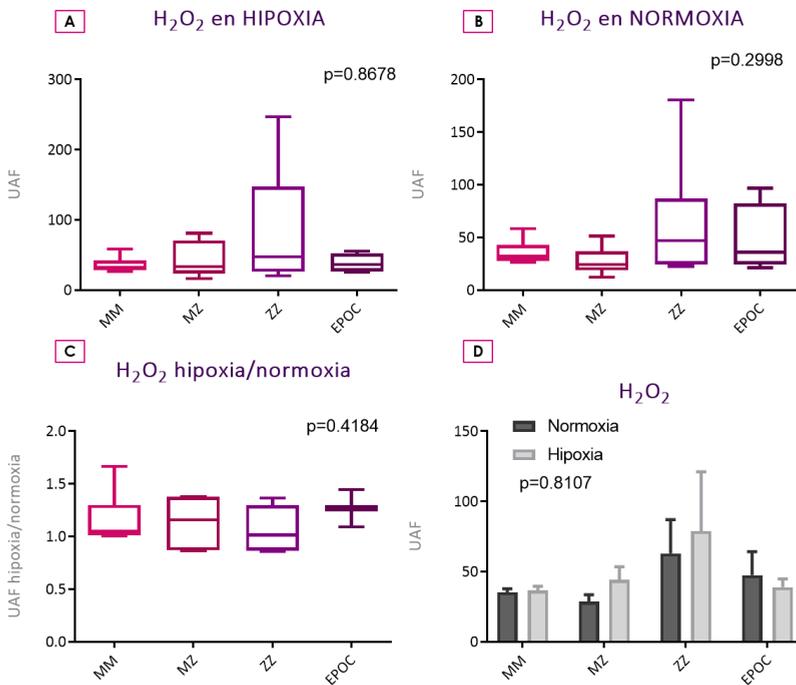


Figura 49. Niveles de H_2O_2 en los pacientes con DAAT y en controles en edad adulta. H_2O_2 intracelulares medidos a través de la fluorescencia emitida por DCFH₂DA, en cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

En cuanto a los análisis de los pacientes con mayor riesgo de desarrollar enfermedad respecto a los controles con o sin EPOC, no mostraron significación estadística (Figura 50) aunque, en los pacientes ZZ afectados de EPOC, los niveles son superiores al resto de grupos (Figura 50A y B).

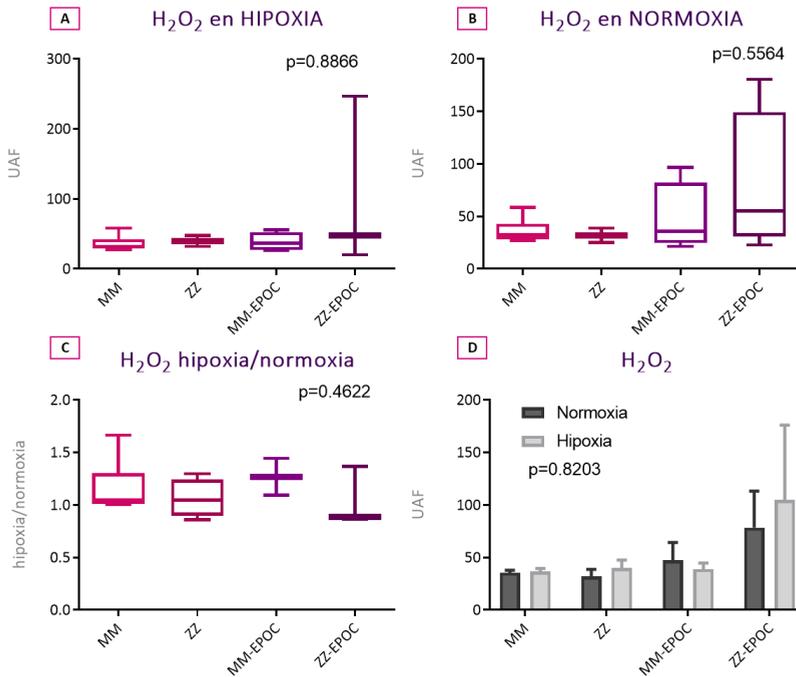


Figura 50. Niveles de H₂O₂ en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles. H₂O₂ intracelulares medidos a través de la fluorescencia emitida por DCFH₂DA, en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. * = p < 0.05 ** = p < 0.01, *** = p < 0.001.

RESULTADOS

Respecto a los cambios en la producción de H_2O_2 provocados por la terapia de reposición, los análisis comparativos no mostraron diferencias significativas (Figura 51).

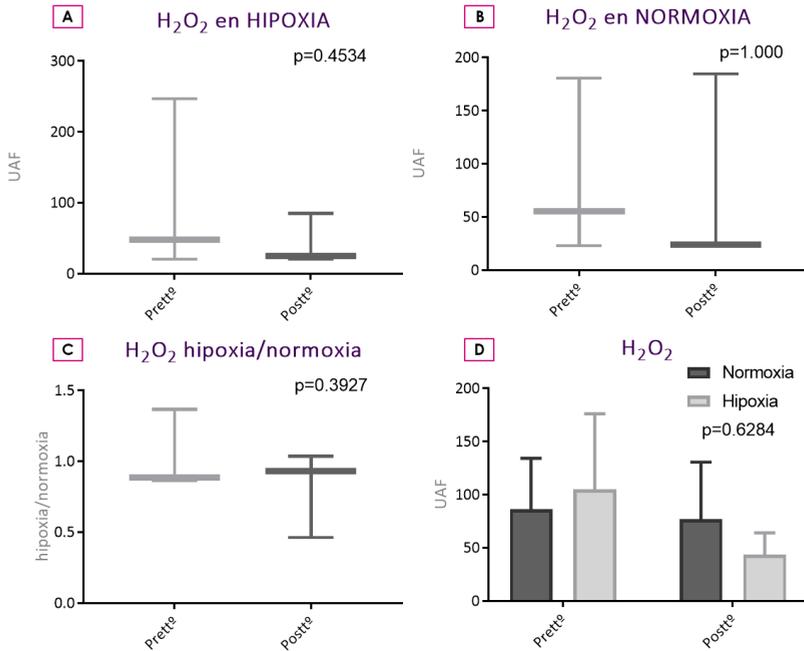


Figura 51. Niveles de H_2O_2 en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de H_2O_2 en neutrófilos de los pacientes ZZ antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Respecto al O_2^- , no se encontraron diferencias entre los grupos de estudio en los análisis comparativos realizados de acuerdo al fenotipo (Figura 52).

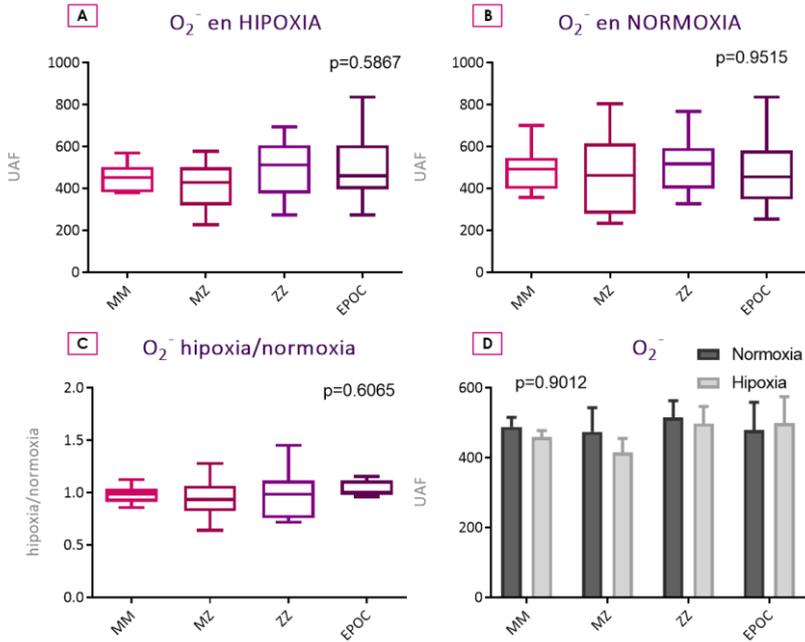


Figura 52. Niveles del anión O_2^- en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta. O_2^- intracelular medido a través de la fluorescencia emitida por HE, en cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Los niveles de anión O_2^- en los pacientes ZZ con o sin EPOC, en comparación a sus respectivos controles, no mostraron diferencias significativas en condiciones de hipoxia ($p=0,6313$) (Figura 53A) ni en normoxia ($p=0,9298$) (Figura 53B), mientras que la *ratio* entre los niveles de hipoxia y normoxia, indicó diferencias en los pacientes ZZ con y sin EPOC ($p=0,0126$) (Figura 53C).

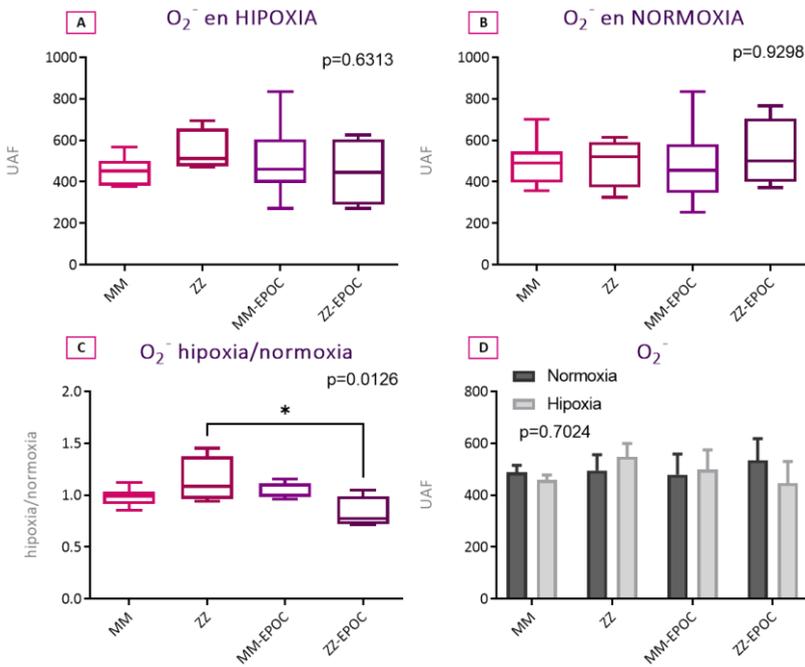


Figura 53. Niveles de anión O_2^- en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles. O_2^- intracelular medido a través de la fluorescencia emitida por HE, en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

RESULTADOS

Respecto a los cambios en la producción de O_2^- por los neutrófilos provocados por la terapia de reposición, los análisis comparativos no mostraron diferencias significativas (Figura 54). No obstante, se observa un ligero descenso en O_2^- a los 5 días de tratamiento (Figura 54A y B).

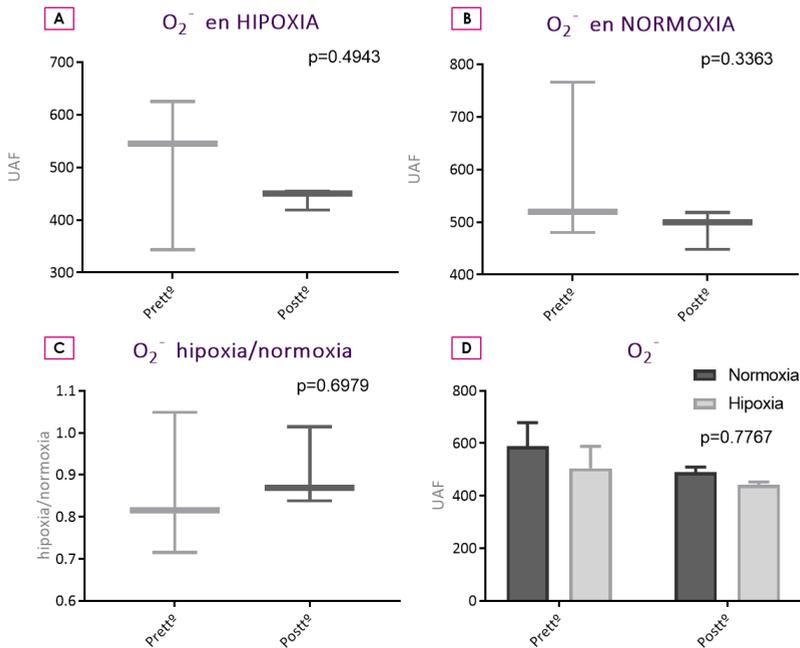


Figura 54. Niveles de O_2^- en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de O_2^- en neutrófilos de pacientes ZZ, antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. $^* = p < 0.05$
 $^{**} = p < 0.01$, $^{***} = p < 0.001$.

RESULTADOS

b) Producción de especies reactivas derivadas del nitrógeno (RNS)

Por lo que respecta a la producción de NO, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, ni bajo condiciones de hipoxia ($p=0,1834$) ni de normoxia ($p=0,3324$) (Figura 55A y B). Tampoco se encontraron en la *ratio* hipoxia/normoxia ($p=0,5253$) (Figura 55C). Respecto a la comparación entre las medias en la producción de NO, tanto en hipoxia como en normoxia, pese a no alcanzar significación estadística, en todos los grupos de estudio la producción es mayor bajo condiciones de hipoxia (Figura 55D).

RESULTADOS

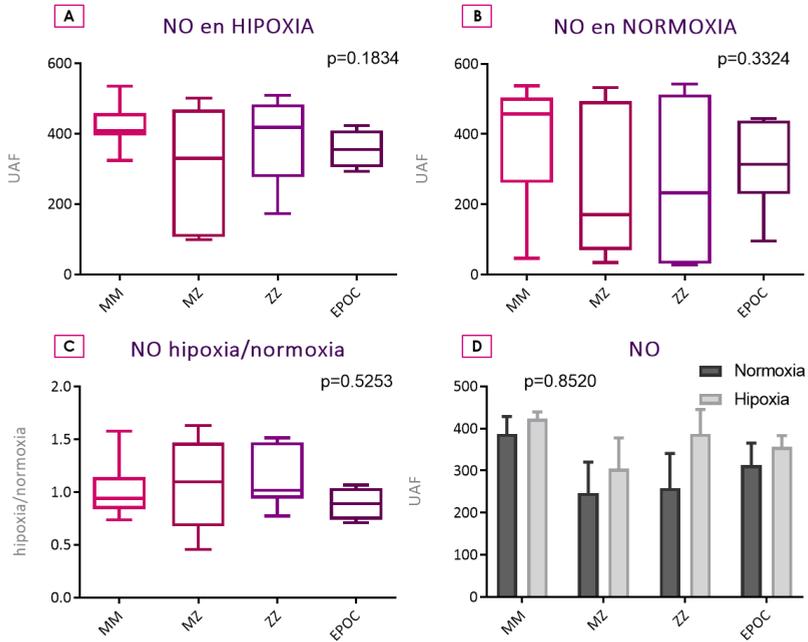


Figura 55. Niveles de NO en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta . NO intracelular medido a través de la fluorescencia emitida por DAF-FM, en cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *=p<0.05 ** = p<0.01, * = p<0.001.**

RESULTADOS

Tampoco se encontraron diferencias en los análisis comparativos de los niveles de NO, entre controles y pacientes ZZ, con o sin EPOC (Figura 56). Igualmente se observa que, en todos los grupos de estudio, pese a no alcanzar significación estadística, la producción es mayor bajo condiciones de hipoxia que en los incubados en normoxia (Figura 56D).

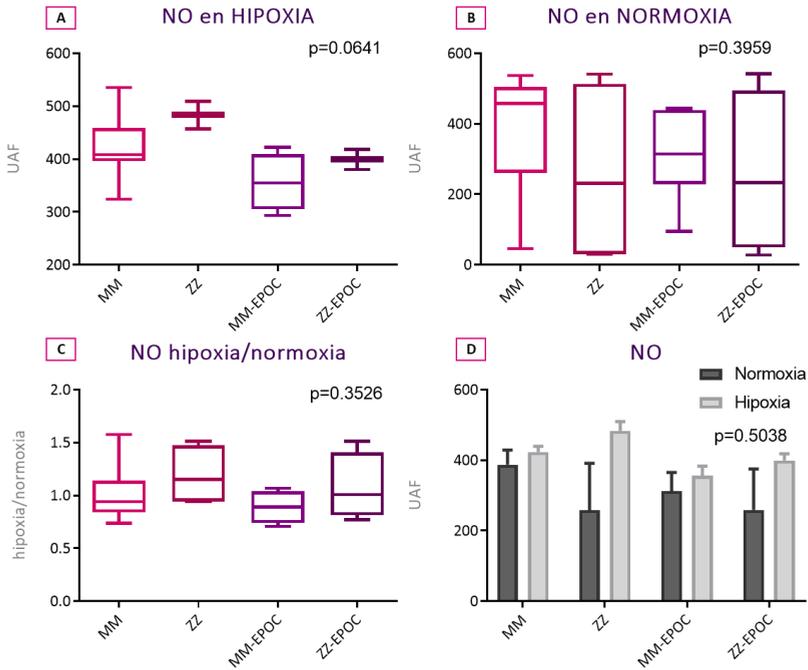


Figura 56. Niveles de NO en pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles. NO intracelular medido a través de la fluorescencia emitida por DAF-FM, en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

En cuanto al efecto de la terapia de reposición en la producción de NO, los análisis comparativos no mostraron diferencias significativas (Figura 57). No obstante, se observa un ligero descenso del NO a los 5 días de haber iniciado el tratamiento (Figura 57A y B).

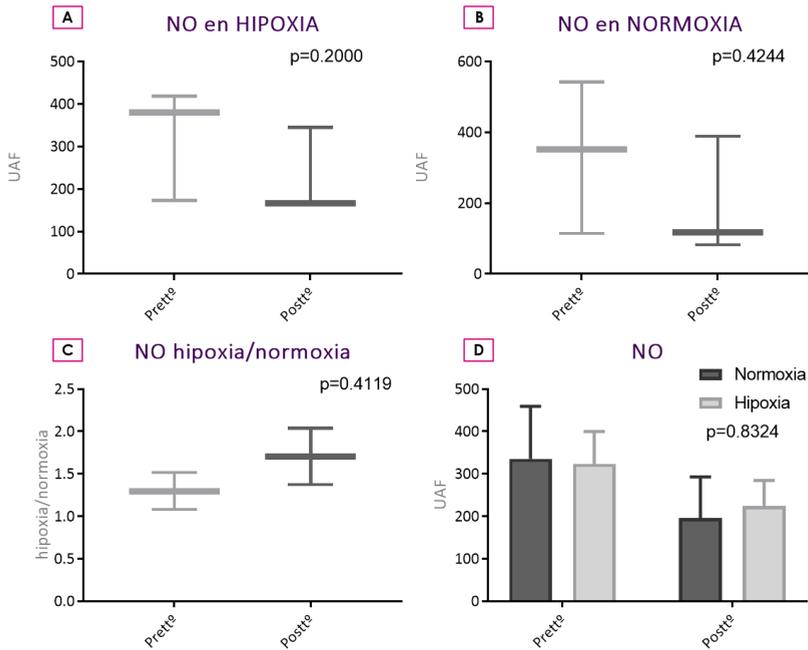


Figura 57. Niveles de NO en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de NO en neutrófilos de pacientes ZZ, antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

c) Función mitocondrial

Se estudiaron parámetros relacionados con la función mitocondrial: O_2^- mitocondrial y $\Delta\Psi_m$. Por lo que respecta a los niveles de O_2^- mitocondrial en neutrófilos, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0284$) entre los diferentes fenotipos bajo condiciones de hipoxia. Las pruebas de análisis múltiple mostraron que los pacientes ZZ presentan niveles significativamente incrementados de O_2^- mitocondrial respecto a los detectados en los pacientes MZ ($p=0,0197$) (Figura 58A), aunque estas diferencias no existían bajo condiciones de normoxia ($p=0,0941$) (Figura 58B). No se encontraron diferencias entre fenotipos, en los análisis comparativos del cociente entre los niveles obtenidos en condiciones de hipoxia y normoxia (Figura 58C), ni en las comparaciones entre hipoxia y normoxia, en cada grupo de estudio ($p=0,8123$) (Figura 58D). Sin embargo, en los neutrófilos MZ y ZZ, se observa un ligero incremento en la producción de O_2^- mitocondrial en condiciones de hipoxia y respecto a la normoxia (Figura 58D).

RESULTADOS

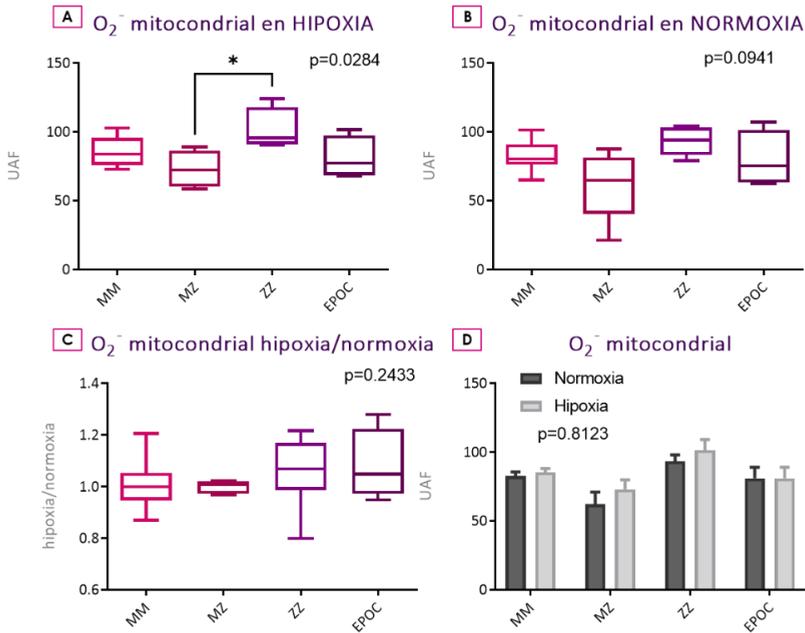


Figura 58. Niveles de anión O_2^- mitocondrial en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta. O_2^- intracelular medido a través de la fluorescencia emitida por mitoSOX, en cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Tampoco se apreciaron diferencias en los análisis comparativos de los niveles de anión O_2^- mitocondrial, entre los controles y los pacientes ZZ con o sin EPOC (Figura 59), aunque los neutrófilos de los ZZ-EPOC parecen generar niveles mayores de dicha especie tanto en hipoxia como en normoxia. En los grupos ZZ con y sin EPOC fueron ligeramente superiores a los obtenidos bajo condiciones de normoxia (Figura 59D).

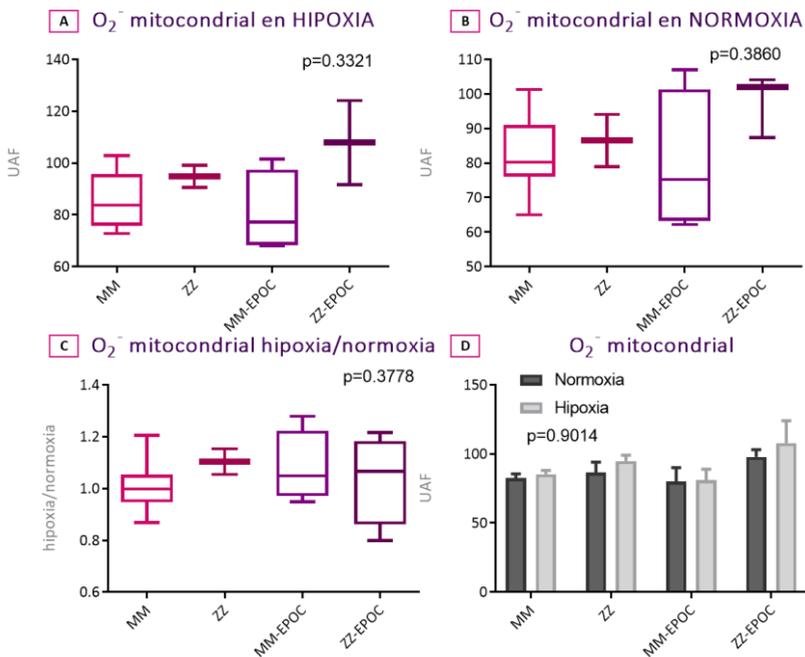


Figura 59. Niveles de anión O_2^- mitocondrial en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta. O_2^- mitocondrial medido a través de la fluorescencia emitida por mitoSOX, en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

RESULTADOS

Los análisis comparativos respecto al efecto de la terapia de reposición en el O_2^- mitocondrial no mostraron diferencias significativas (Figura 60).

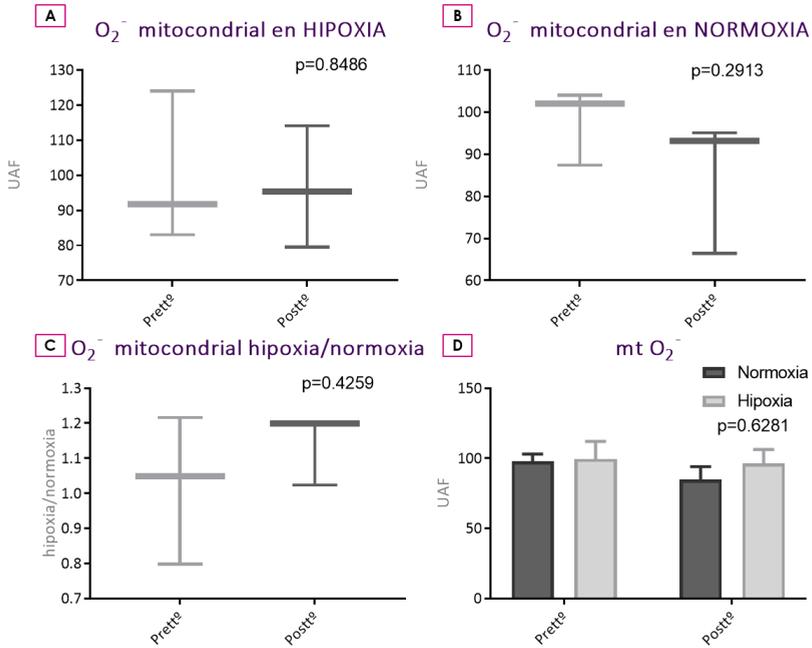


Figura 60. Niveles de O_2^- mitocondrial en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de O_2^- mitocondrial en neutrófilos de pacientes ZZ, antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

No se observaron diferencias estadísticamente significativas, entre los diferentes fenotipos en condiciones de hipoxia; ni en el caso del análisis de los neutrófilos incubados en hipoxia, normalizado frente a normoxia, ni en la comparación entre hipoxia y normoxia en cada grupo, en el $\Delta\Psi_m$ (Figura 61). Sin embargo, respecto a esta última comparación, el incremento del $\Delta\Psi_m$ era mayor en hipoxia que en normoxia en todos los grupos de estudio, aunque sin significación estadística (Figura 61D).

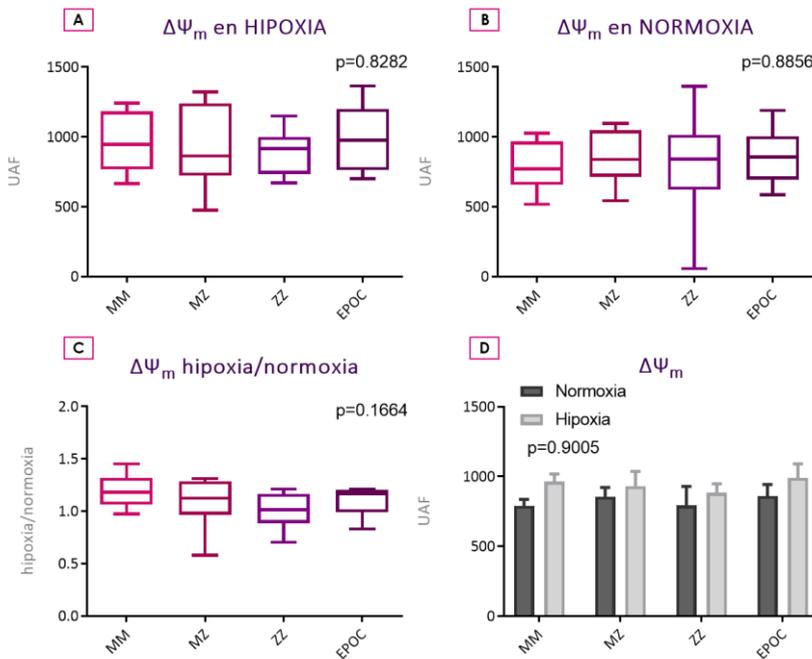


Figura 61. Potencial de membrana mitocondrial en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta. $\Delta\Psi_m$ medido a través de la fluorescencia emitida por TMRM, en cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

RESULTADOS

Del mismo modo, no se encontraron diferencias en los análisis comparativos del $\Delta\Psi_m$, entre controles y los pacientes ZZ, con o sin EPOC (Figura 62).

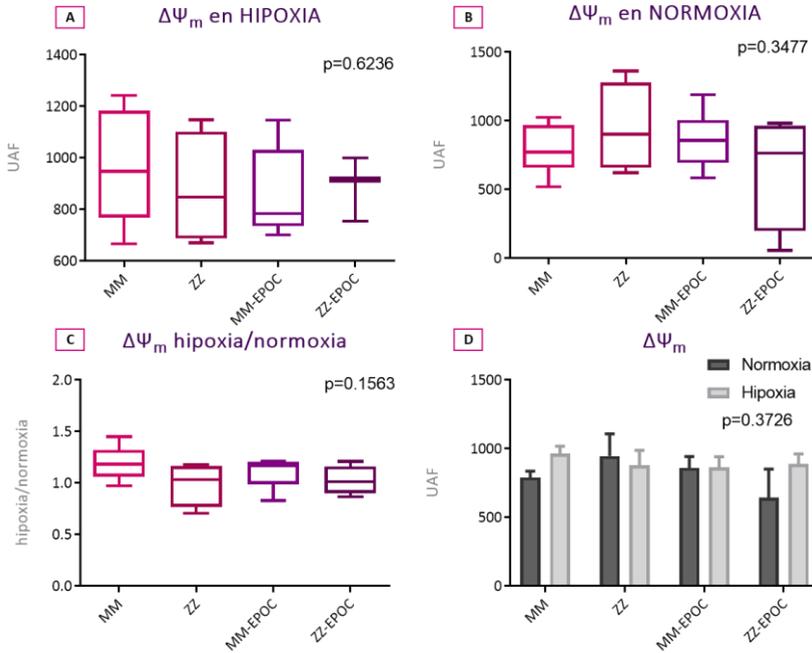


Figura 62. Potencial de membrana mitocondrial en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta. $\Delta\Psi_m$ medido a través de la fluorescencia emitida por TMRM, en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *=p<0.05 ** = p<0.01, * = p<0.001.**

RESULTADOS

En referencia a los análisis comparativos respecto a la terapia de reposición, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al $\Delta\Psi_m$ (Figura 63). No obstante, este potencial parece incrementarse tras el tratamiento (Figura 63A y B).

RESULTADOS

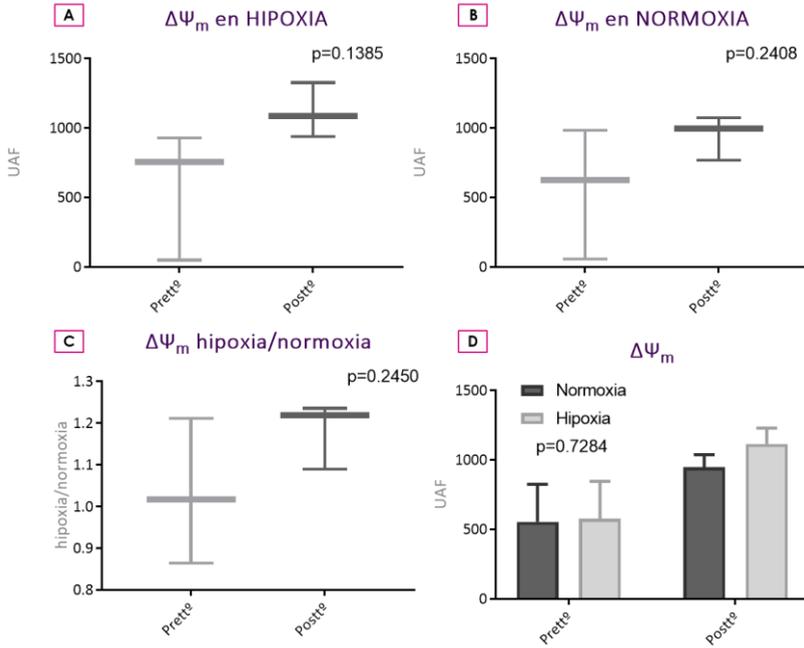


Figura 63. Niveles de potencial de membrana mitocondrial en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de $\Delta\Psi_m$ en neutrófilos de pacientes ZZ antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

RESULTADOS

d) Daño oxidativo en las biomoléculas

Por lo que respecta al contenido de proteínas carboniladas en los neutrófilos, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0478$), entre los diferentes fenotipos bajo condiciones de hipoxia, estando incrementadas en los pacientes MZ y ZZ en comparación con los controles sanos (Figura 64A). No obstante, estas diferencias no se apreciaron entre los neutrófilos de diferentes fenotipos bajo condiciones de normoxia ($p=0,6238$) (Figura 64B), ni en el cociente hipoxia/ normoxia ($p=0,7078$) (Figura 64C). En cuanto a la comparación entre las medias de proteínas carboniladas en hipoxia y normoxia en los grupos MZ y ZZ se encontraron aumentadas, a pesar de no alcanzar significación estadística (Figura 64D).

RESULTADOS

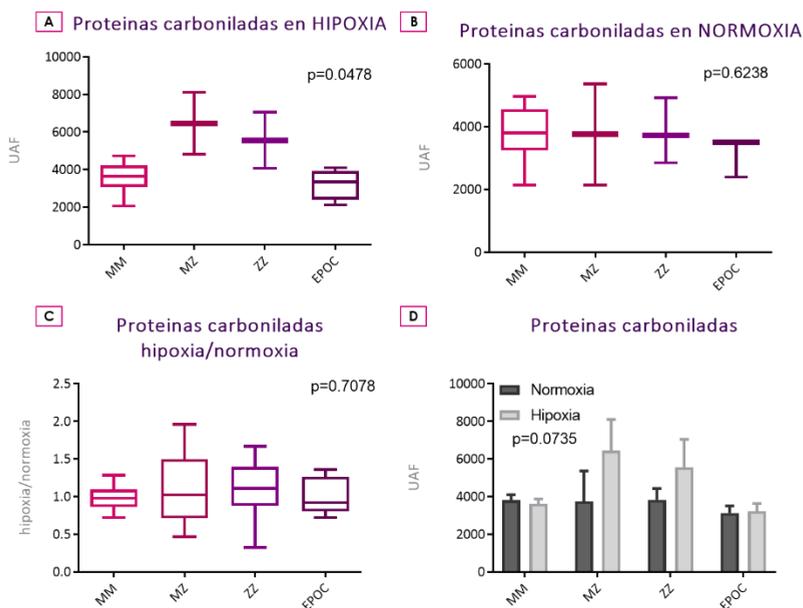


Figura 64. Niveles de proteínas carboniladas en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta. Proteínas carboniladas medidas a través de la fluorescencia emitida por FTC, en cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Los análisis comparativos entre los pacientes ZZ y los controles, con o sin EPOC, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de proteínas carboniladas, ni en condiciones de hipoxia ($p=0,3458$) ni bajo condiciones de normoxia ($p=0,1566$) (Figura 65A y B). A pesar de no alcanzar la significación estadística, se observa que las proteínas carboniladas están aumentadas en los neutrófilos ZZ-EPOC cuando se incuban bajo condiciones de hipoxia (Figura 65A) e igualmente el cociente entre hipoxia y normoxia es mayor en los pacientes ZZ respecto a los controles sanos ($p=0,1801$) (Figura 65C). Los resultados mostraron diferencias significativas entre los neutrófilos de pacientes ZZ con EPOC bajo condiciones de hipoxia, en comparación con los obtenidos en condiciones de normoxia ($p=0,0042$); esta diferencia no llegó a alcanzar significación estadística en los pacientes ZZ en ausencia de EPOC ($p=0,6931$) (Figura 65D).

RESULTADOS

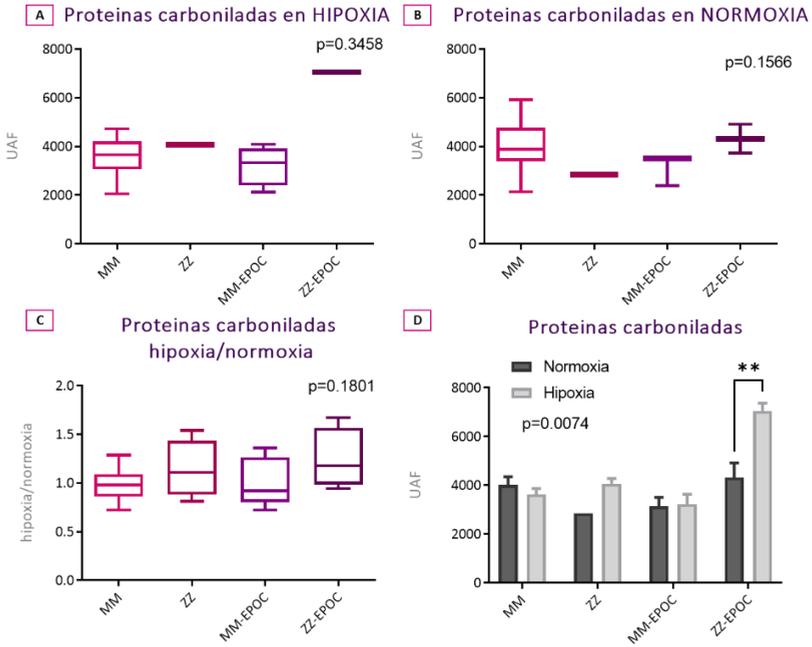


Figura 65. Niveles de proteínas carboniladas en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta. Proteínas carboniladas medidas a través de la fluorescencia emitida por FTC, en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

En referencia a los cambios en los niveles de proteínas carboniladas en relación a la terapia de reposición, bajo condiciones de hipoxia se encontraron diferencias significativas entre el momento previo y a los 5 días del tratamiento ($p=0,0148$) (Figura 66A). Estas diferencias no se observaron en el resto de análisis comparativos realizados (Figura 66).

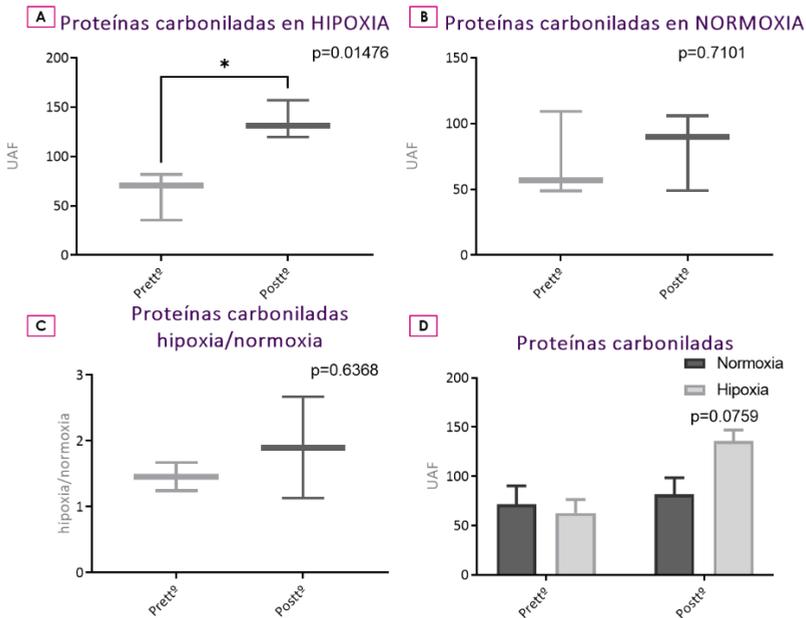


Figura 66. Niveles de proteínas carboniladas en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de proteínas carboniladas en neutrófilos de pacientes ZZ antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. $*$ = $p < 0.05$ $**$ = $p < 0.01$, $***$ = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Respecto a los niveles de peroxidación lipídica, no hubo diferencias estadísticamente significativas en los análisis comparativos realizados separando los grupos según su fenotipo (Figura 67).

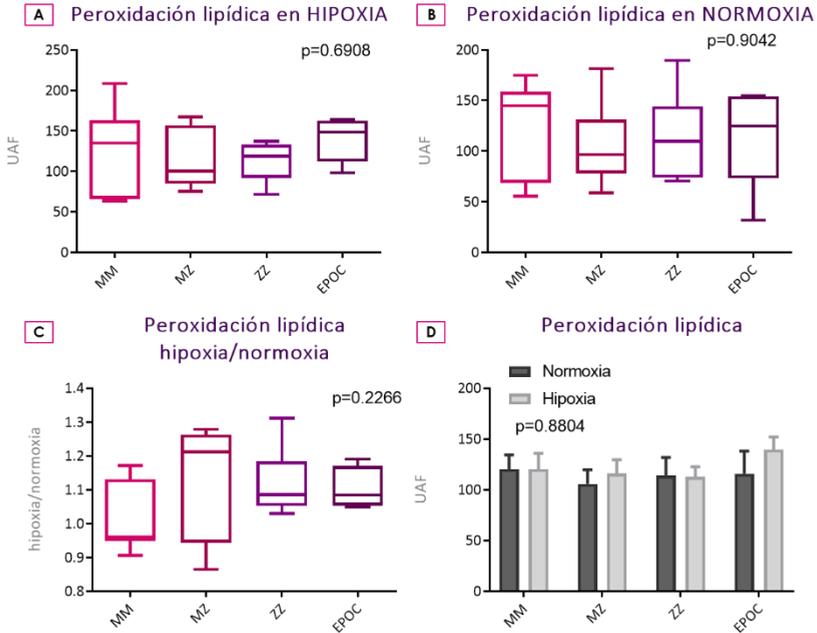


Figura 67. Niveles de lípidos peroxidados en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta. Peroxidación lipídica medida a través de la fluorescencia emitida por BODIPY, en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. $*=p<0.05$ $**=p<0.01$, $***=p<0.001$.

RESULTADOS

Tampoco se observaron diferencias al agruparlos por daño pulmonar (Figura 68).

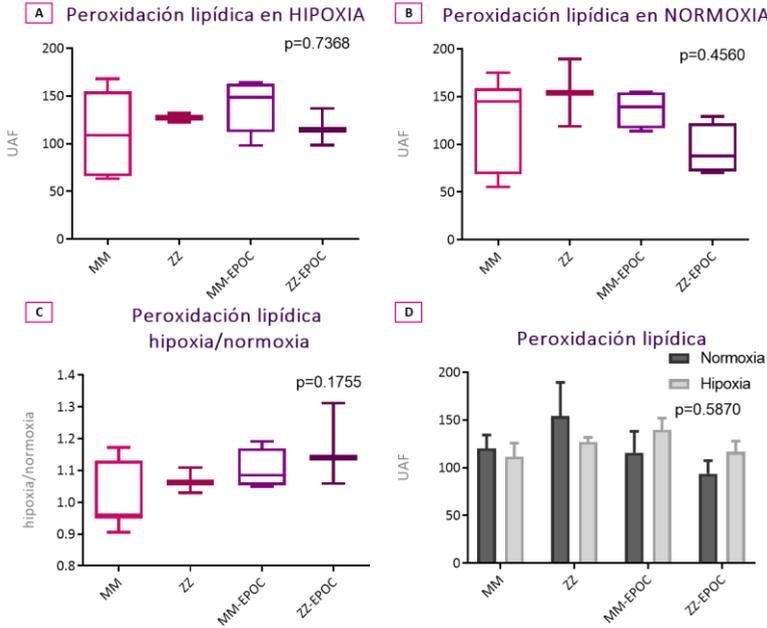


Figura 68. Niveles de lípidos peroxidados en los pacientes ZZ, con o sin EPOC y en los controles en edad adulta. Lípidos peroxidados medidos a través de la fluorescencia emitida por BODIPY, en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Las diferencias no fueron significativas entre los lípidos peroxidados medidos en el momento previo y posterior a la administración de la terapia de reposición (Figura 69).

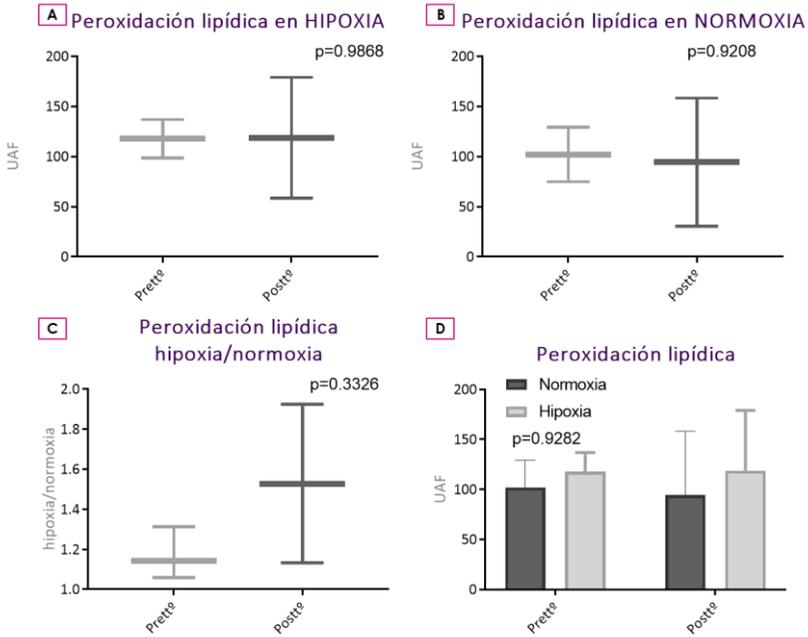


Figura 69. Niveles de lípidos peroxidados en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de lípidos peroxidados en neutrófilos de pacientes ZZ, antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

4.8. Determinación de la defensa antioxidante en pacientes con DAAT

Para determinar la defensa antioxidante de los neutrófilos procedentes de niños y adultos con DAAT y voluntarios sanos, estas células fueron incubadas y estimuladas bajo las condiciones pertinentes. Tras ello, se procedió a la detección de la defensa antioxidante no enzimática, en concreto los niveles intracelulares de tioles y glutatión mediante citometría de flujo. Por otro lado, se detectó la expresión a nivel del ARNm de diferentes enzimas antioxidantes mediante q-RT-PCR.

4.8.1. Detección de antioxidantes no enzimáticos en los pacientes con DAAT

4.8.1.1. Detección de tioles intracelulares en la edad pediátrica

En cuanto a la presencia de tioles en los neutrófilos de los diferentes fenotipos, se observaron diferencias estadísticamente significativas bajo condiciones de hipoxia ($p=0,0142$), concretamente las pruebas de análisis múltiple mostraron que los pacientes SZ presentan niveles significativamente incrementados de tioles reducidos respecto al grupo control ($p=0,0113$) (Figura 70A). No se encontraron diferencias entre los fenotipos bajo condiciones de normoxia ($p=0,3255$) (Figura 70B). Los análisis comparativos tampoco mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio en los

RESULTADOS

cocientes hipoxia/normoxia ($p=0,3132$) (Figura 70C). Tampoco se encontraron diferencias entre las medias de hipoxia y normoxia en cada uno de los grupos de estudio ($p=0,5653$) (Figura 70D).

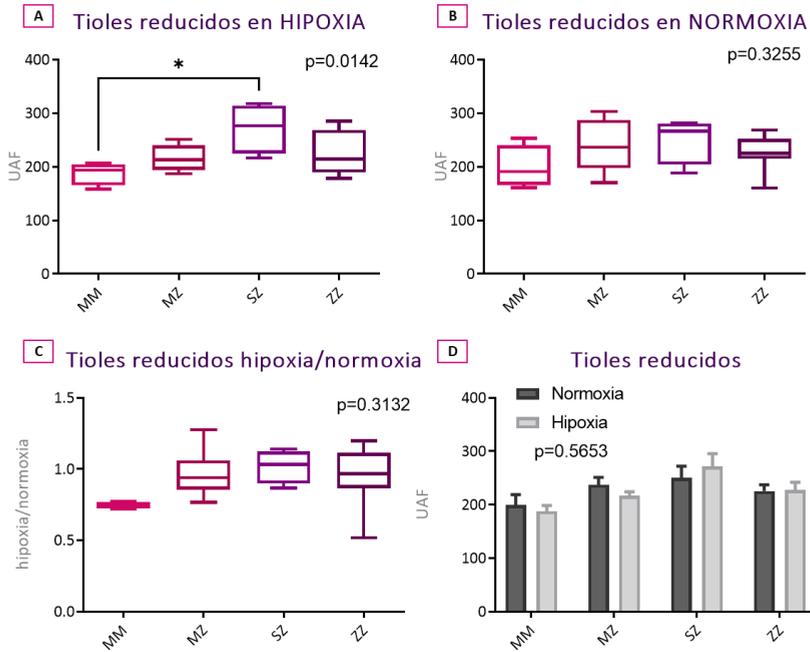


Figura 70. Niveles de tioles reducidos en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica. Tioles reducidos medidos a través de la fluorescencia emitida por CMFDA, en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. $*=p<0.05$
 $** = p<0.01$, $*** = p<0.001$.

RESULTADOS

Los neutrófilos procedentes de niños con DAAT, incubados bajo condiciones de hipoxia, presentaron diferencias significativas en los niveles de GSH ($p=0,0393$) entre los fenotipos, siendo los de los pacientes SZ significativamente mayores ($p=0,0328$) que los de los controles (Figura 71A). Asimismo, se encontraron diferencias significativas entre los pacientes MZ y ZZ ($p=0,0247$) al comparar, en cada uno de ellos, los valores del cociente entre los niveles obtenidos en condiciones de hipoxia y de normoxia ($p=0,0121$) (Figura 71C). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre los fenotipos bajo condiciones de normoxia ($p=0,1679$) (Figura 71B), así como tampoco al comparar las medias bajo hipoxia y normoxia en cada grupo de estudio ($p=0,7186$) (Figura 71D). Cabe destacar que, en hipoxia, las medias de presencia de GSH en neutrófilos SZ y ZZ son ligeramente mayores que las mismas en normoxia, aunque no llegan a alcanzar significación estadística (Figura 71D).

RESULTADOS

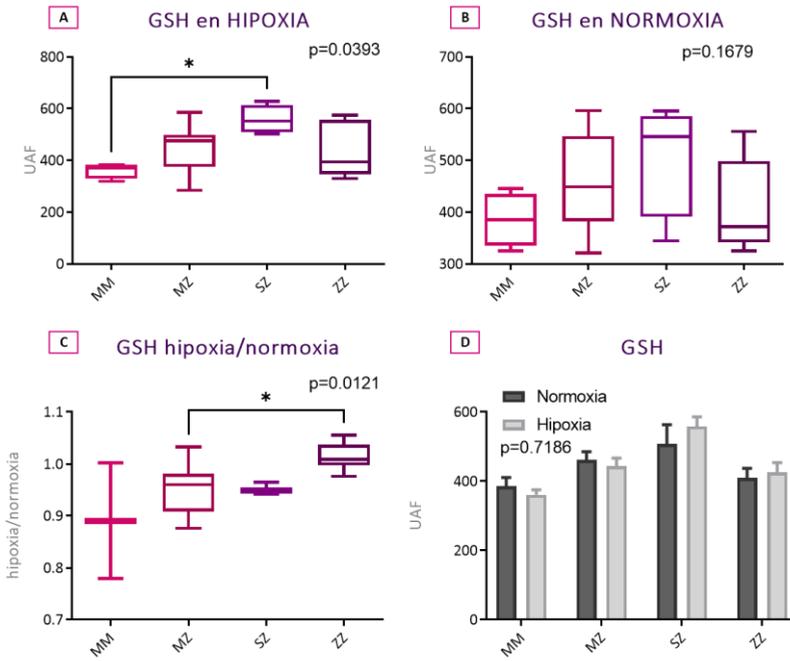


Figura 71. Niveles de GSH en los pacientes con DAAT y en los controles en edad pediátrica. GSH intracelular medido a través de la fluorescencia emitida por MCB, en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

4.8.1.2. Detección de tioles en los pacientes con DAAT en la edad adulta

Los niveles de tioles en los neutrófilos de los diferentes fenotipos, no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,1113$) entre los diferentes grupos bajo condiciones de hipoxia (Figura 72A). Estas diferencias tampoco existían entre los fenotipos bajo condiciones de normoxia ($p=0,5036$) (Figura 72B). Asimismo, tampoco se observaron diferencias entre los distintos grupos, en el cociente entre los niveles bajo condiciones de hipoxia y normoxia ($p=0,0750$) (Figura 72C), ni en la comparación entre hipoxia y normoxia de cada grupo de estudio ($p=0,3828$) (Figura 72D).

RESULTADOS

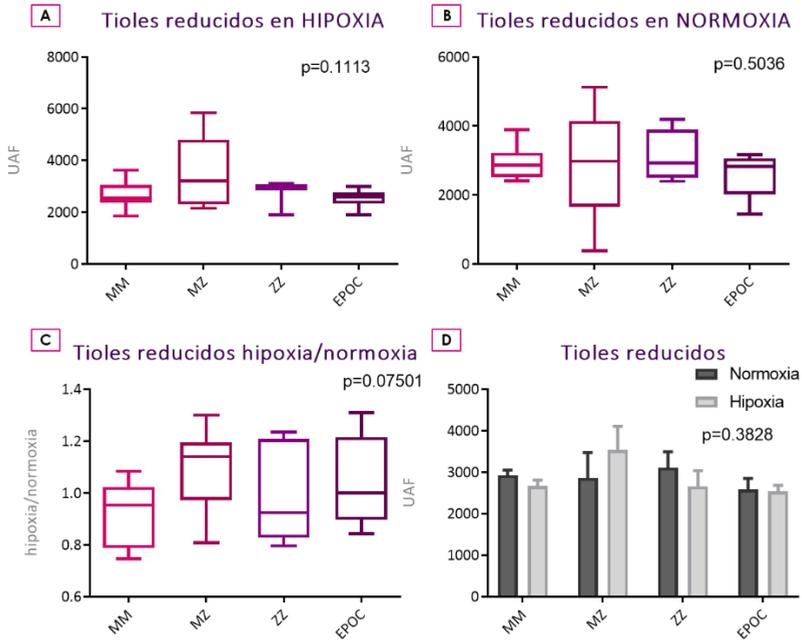


Figura 72. Niveles de tioles reducidos en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta. Tioles reducidos medidos a través de la fluorescencia emitida por CMFDA, en cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Tampoco se encontraron diferencias en los análisis comparativos entre controles y pacientes ZZ, con o sin EPOC (Figura 73).

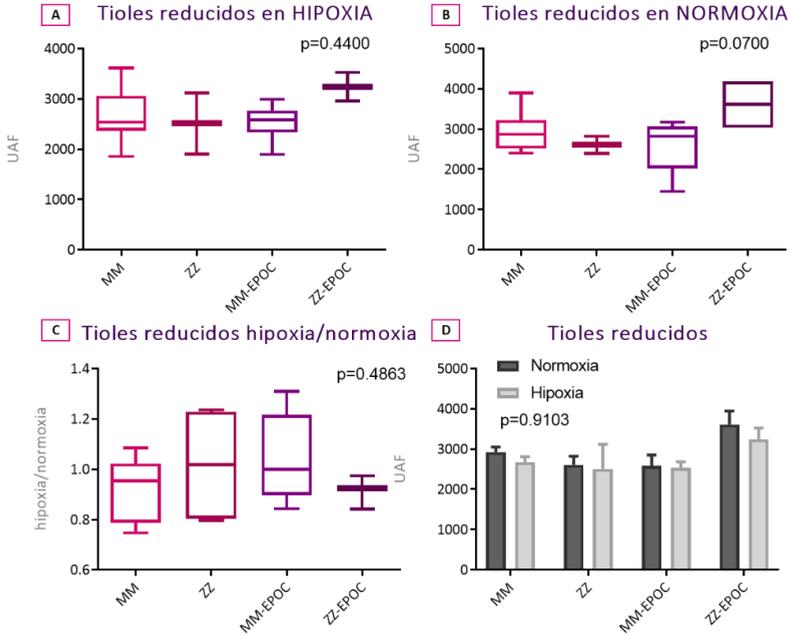


Figura 73. Niveles de tioles en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta. Tioles intracelulares medidos a través de la fluorescencia emitida por CMFDA, en cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

En cuanto a los análisis comparativos respecto a la terapia de reposición, tampoco se encontraron diferencias significativas en el contenido en tioles reducidos (Figura 74).

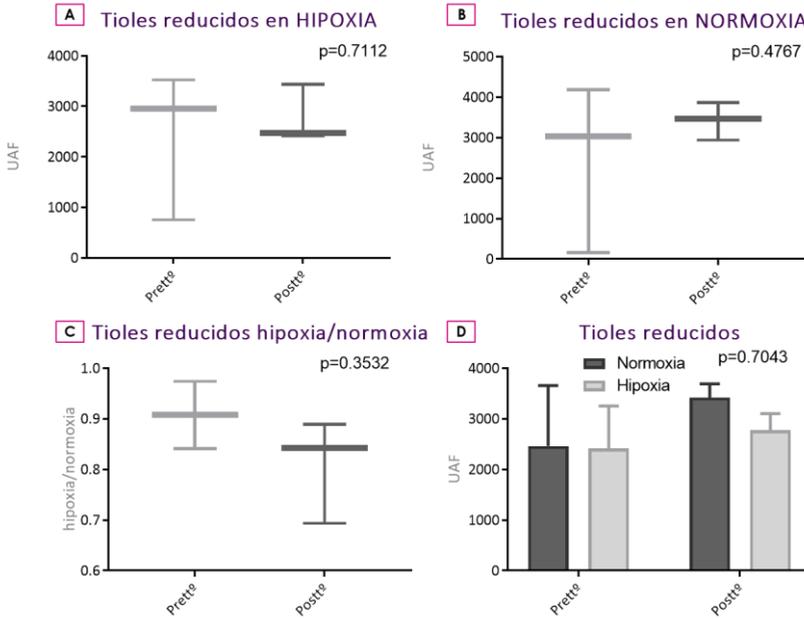


Figura 74. Niveles de tioles reducidos en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de tioles reducidos en neutrófilos de pacientes ZZ antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. $*$ = $p<0.05$ $**$ = $p<0.01$, $***$ = $p<0.001$.

RESULTADOS

Por el contrario, los valores de GSH, a pesar de no mostrar diferencias entre fenotipos, en condiciones de hipoxia, sí las presentaron diferencias entre los grupos de estudio en los niveles de GSH en condiciones de hipoxia normalizada frente a la normoxia ($p=0,0033$) (Figura 75A y B). Se encontraron niveles más elevados en los pacientes con EPOC no asociada al DAAT respecto al resto de grupos, MM, MZ y ZZ ($p=0,0067$; $p=0,0047$; $p=0,0039$ respectivamente) en cuanto a la *ratio* entre hipoxia y normoxia (Figura 75C).

RESULTADOS

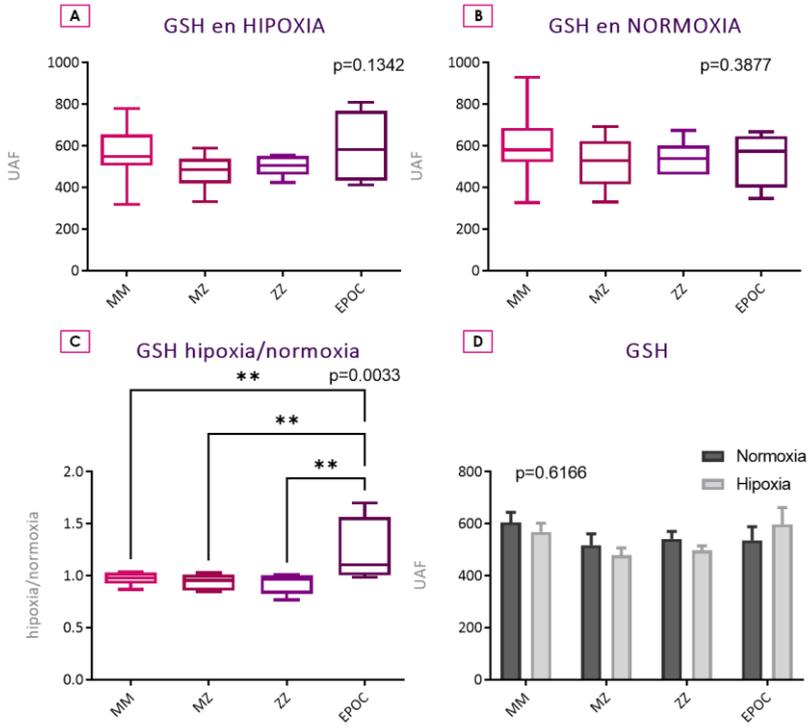


Figura 75. Niveles de GSH en los pacientes con DAAT y en los controles en edad adulta. GSH intracelular medido a través de la fluorescencia emitida por MCB, en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

De la misma manera, se observaron diferencias en el cociente hipoxia/ normoxia, al valorar la variable “presencia o ausencia de EPOC” ($p=0,0106$) (Figura 76C). Los pacientes con EPOC no asociada al DAAT presentaron valores incrementados de GSH frente a los individuos MM y ZZ sin EPOC ($p=0,0067$; $p=0,0039$), aunque ya no se observaron diferencias significativas con el grupo de pacientes ZZ-EPOC (Figura 76C). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el resto de análisis comparativos (Figura 76A, B y C).

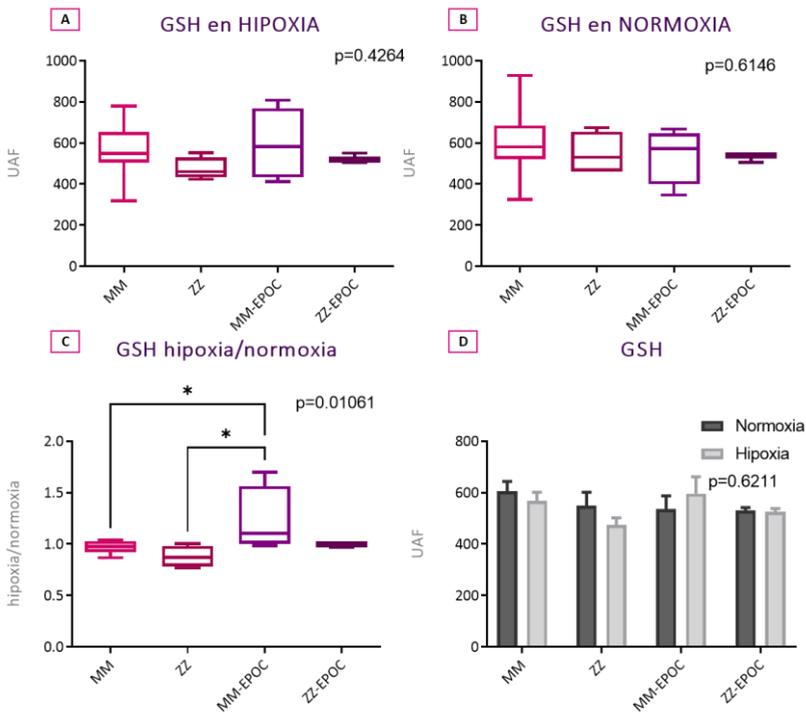


Figura 76. Niveles de GSH en pacientes ZZ, con o sin EPOC y en los controles en edad adulta. GSH intracelular medido a través de la fluorescencia emitida por MCB, en cultivos de neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

RESULTADOS

En cuanto a los análisis comparativos respecto a la terapia de reposición no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la GSH (Figura 77).

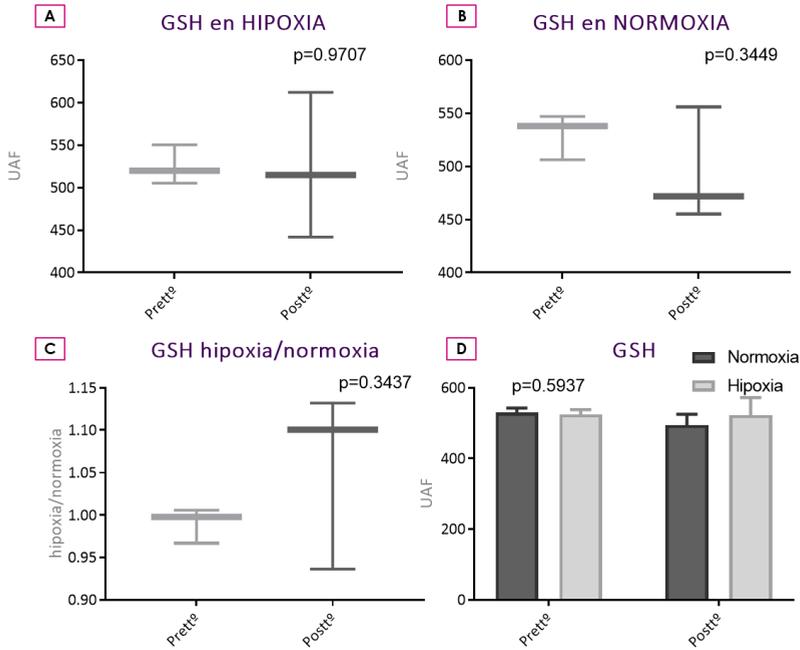


Figura 77. Niveles de GSH en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de O_2^- mitocondrial en neutrófilos de pacientes ZZ antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

4.8.2. Determinación de la expresión de genes antioxidantes en los pacientes con DAAT

4.8.2.1. Expresión de enzimas antioxidantes en la edad pediátrica

En cuanto a la expresión de la enzima SOD1 o citoplasmática a nivel de ARNm en los neutrófilos, los resultados no mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio en niños bajo condiciones de hipoxia ($p=0,1284$) (Figura 78A), ni tampoco bajo condiciones de normoxia ($p=0,4567$) (Figura 78B). Sin embargo, cuando se comparó la expresión en los diferentes fenotipos respecto al cociente entre los niveles obtenidos en hipoxia y normoxia, se observó un descenso significativo en los pacientes ZZ respecto al grupo control ($p=0,0256$) (Figura 78C). Los análisis comparativos entre hipoxia y normoxia dentro de cada grupo tampoco mostraron diferencias significativas ($p=0,3268$) (Figura 78D).

RESULTADOS

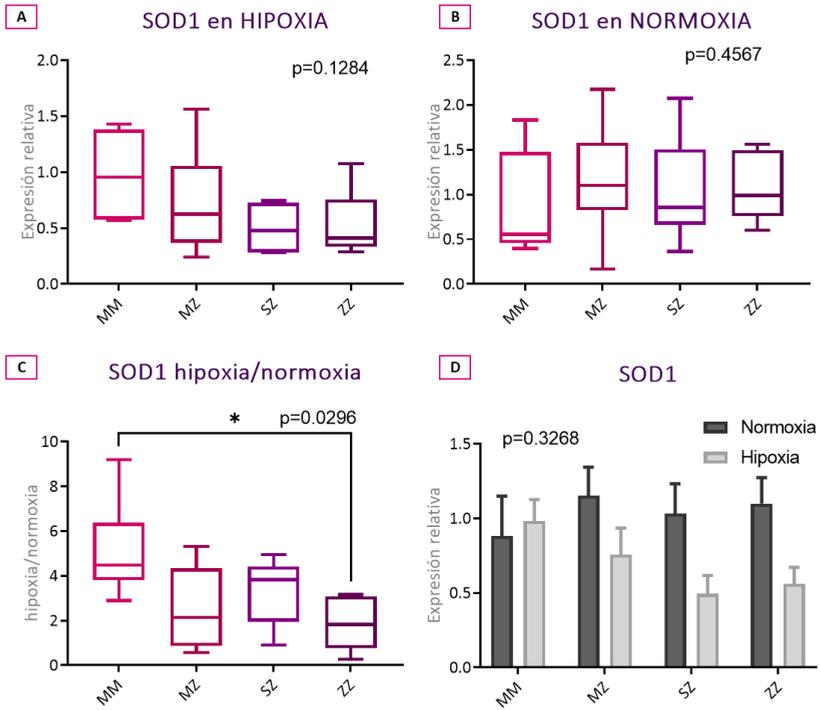


Figura 78. Niveles de expresión del gen SOD citosólica en los pacientes y en los controles en edad pediátrica. Expresión a nivel de ARNm en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Respecto a la expresión de la SOD2 o mitocondrial, se observaron diferencias significativas entre fenotipos bajo condiciones de hipoxia ($p=0,0360$). Los resultados mostraron una disminución significativa en la expresión de SOD2 en los pacientes, en concreto, los pacientes MZ presentan una reducción significativa respecto a los controles MM ($p=0,0270$) (Figura 79A). Las comparaciones en cuanto al cociente entre la expresión en hipoxia/normoxia, no mostraron diferencias significativas entre los fenotipos ($p=0,4480$) (Figura 79C). Sin embargo, al comparar en cada grupo de estudio la expresión, se observó en todos los casos los neutrófilos presentaban mayor expresión génica bajo condiciones de hipoxia que bajo normoxia, y en el caso de los neutrófilos SZ, dicha diferencia resultó ser estadísticamente significativa ($p=0,0238$) (Figura 79D).

RESULTADOS

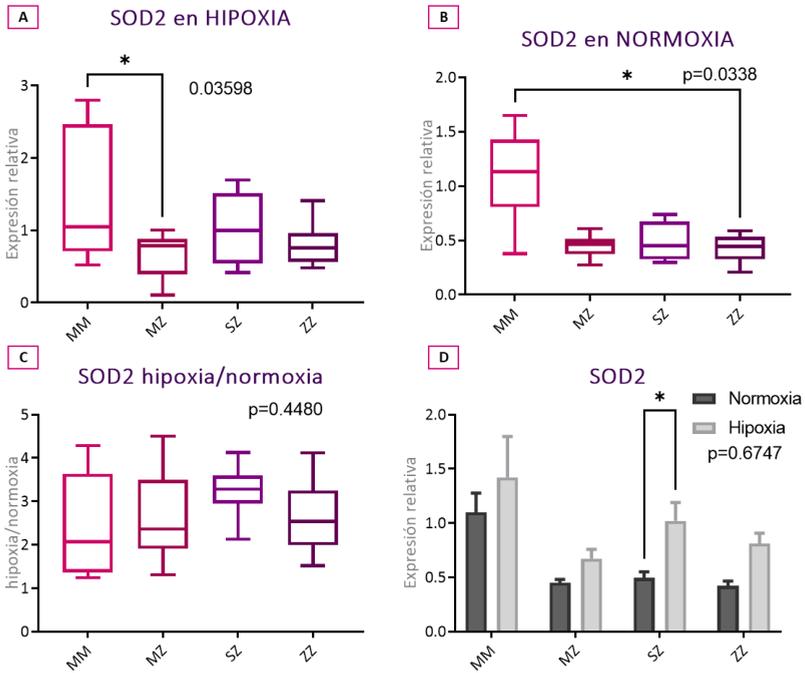


Figura 79. Niveles de expresión del gen que codifica para la SOD mitocondrial en los pacientes y en los controles en edad pediátrica. Expresión a nivel de ARNm en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

RESULTADOS

La expresión a nivel de ARNm del factor de transcripción Nrf2, no mostró diferencias entre los fenotipos expuestos a condiciones de hipoxia ($p=0,4284$), ni tampoco entre los sometidos a normoxia ($p=0,2397$) (Figura 80A y B). Por el contrario, sí que existían diferencias significativas entre los fenotipos en lo referente al cociente entre expresión bajo hipoxia frente a normoxia ($p=0,004$), siendo los niveles de expresión de Nrf2 en los pacientes MZ ($p=0,0023$) y ZZ ($p=0,0366$) significativamente menores en comparación con los de controles MM (Figura 80C). No obstante, tan solo se encontraron diferencias significativas entre hipoxia y normoxia dentro de cada grupo de estudio en los pacientes MZ, siendo la expresión de Nrf2 mayor bajo condiciones de normoxia, mientras que en el resto de grupos de pacientes (SZ y ZZ) las diferencias no llegaron a alcanzar la significación estadística ($p=0,2759$) (Figura 80D).

RESULTADOS

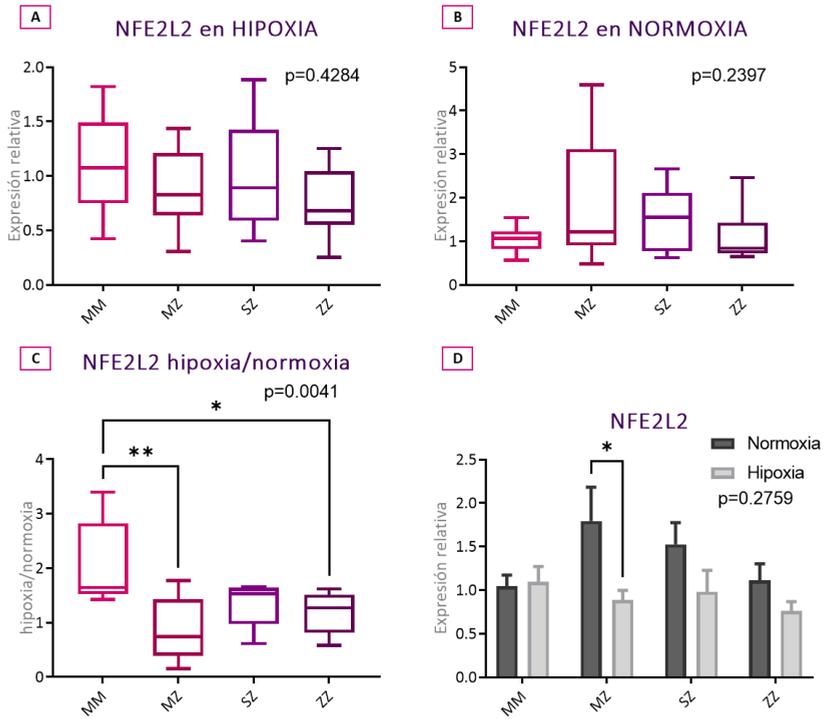


Figura 80. Niveles de expresión del gen que codifica para el Nrf2 en los pacientes y en los controles en edad pediátrica. Expresión a nivel de ARNm en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Los niveles de expresión de la enzima CAT, mostraron diferencias entre los fenotipos bajo condiciones de hipoxia ($p=0,012$), los pacientes ZZ presentaron niveles de expresión disminuidos en comparación con la expresión en los pacientes SZ ($p=0,0098$) (Figura 81A). No obstante, no se encontraron diferencias significativas entre fenotipos en el cociente hipoxia/normoxia ($p=0,2045$) (Figura 81C). Así como tampoco se observaron diferencias significativas entre la expresión bajo hipoxia y bajo normoxia dentro de cada grupo de estudio ($p=0,0242$) (Figura 81D).

RESULTADOS

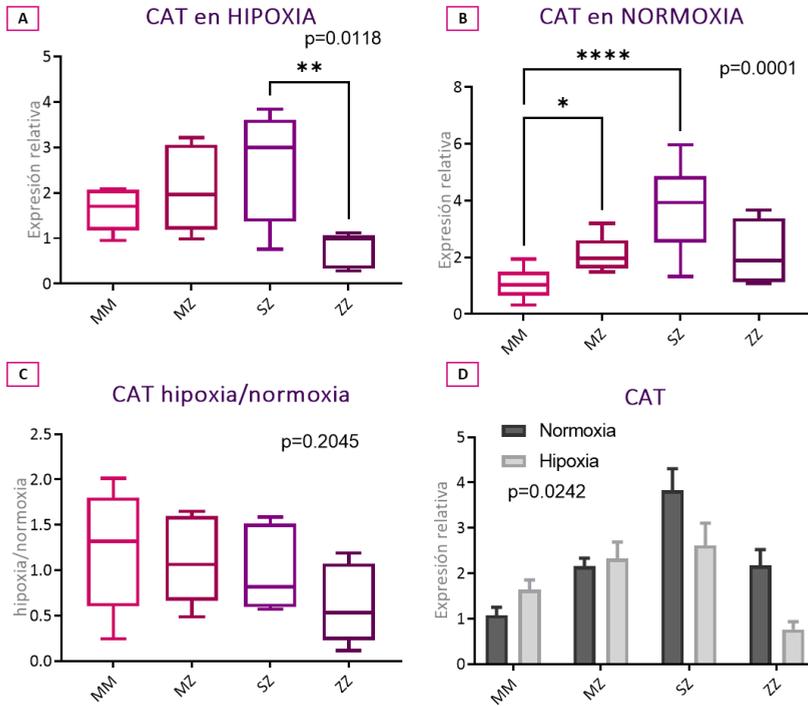


Figura 81. Niveles de expresión del gen que codifica para la CAT en los pacientes y en los controles en edad pediátrica. Expresión a nivel de ARNm en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

En referencia a la expresión de la GPX1, no se encontraron diferencias significativas en los análisis realizados (Figura 82). Sin embargo, a pesar de no llegar a alcanzar significación estadística ($p=0,4209$) se observa un ligero incremento en la expresión de GPX1 en los neutrófilos ZZ respecto al resto de grupos de estudio bajo condiciones de hipoxia (Figura 82A). Además, la expresión de dicha enzima en los pacientes ZZ fue significativamente mayor al incubar las células bajo condiciones de hipoxia que bajo condiciones de normoxia ($p=0,0117$) (Figura 82D).

RESULTADOS

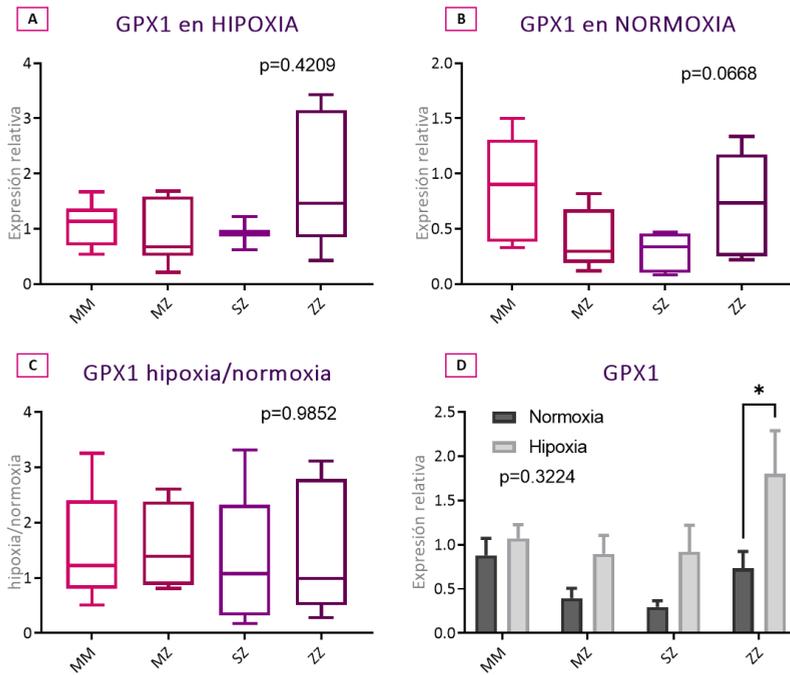


Figura 82. Niveles de expresión del gen de la glutatión peroxidasa en los pacientes y en los controles en edad pediátrica. Expresión a nivel de ARNm en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Los neutrófilos procedentes de niños expuestos a hipoxia mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio en la expresión de GR ($p=0,0004$). Las pruebas de análisis múltiple mostraron diferencias significativas entre los pacientes MZ ($p=0,0020$) y ZZ ($p=0,0005$) en comparación con el grupo control MM, incubados en hipoxia (Figura 83A). No se encontraron diferencias significativas entre los fenotipos bajo condiciones de normoxia ($p=0,3791$) (Figura 83B). Respecto a las comparaciones del cociente hipoxia/normoxia, los resultados indicaron una reducción significativa en los pacientes MZ ($p=0,0387$) y ZZ ($p=0,0182$) respecto al grupo control (Figura 83C). Por el contrario, no se observaron diferencias entre los valores en hipoxia y normoxia en cada grupo de estudio ($p=0,3810$) (Figura 83D).

RESULTADOS

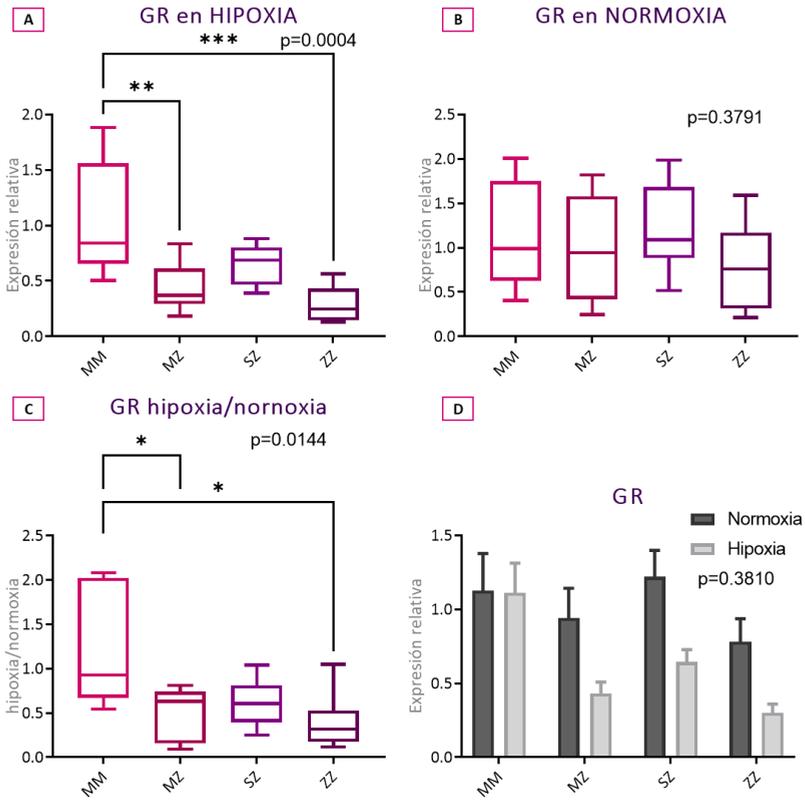


Figura 83. Niveles de expresión del gen que codifica para la glutatión reductasa en los pacientes y en los controles en edad pediátrica. Expresión a nivel de ARNm en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

4.8.2.2. Expresión de enzimas antioxidantes en la edad adulta

Los niveles de expresión del gen de la SOD1 o citosólica de los pacientes respecto a los controles no mostraron diferencias significativas ($p=0,0706$) bajo condiciones de hipoxia (Figura 84A). No se observaron diferencias significativas entre los fenotipos bajo condiciones de normoxia ($p=0,4538$) (Figura 84B). En cuanto a la *ratio* entre la expresión en condiciones de hipoxia y normoxia ($p=0,2273$) (Figura 84C). Sin embargo, en condiciones de hipoxia, la expresión de la SOD1 es mayor en el grupo de pacientes MZ ($p=0,0024$) y también en los ZZ ($p=0,0404$), respecto a la misma en condiciones de normoxia (Figura 84D).

RESULTADOS

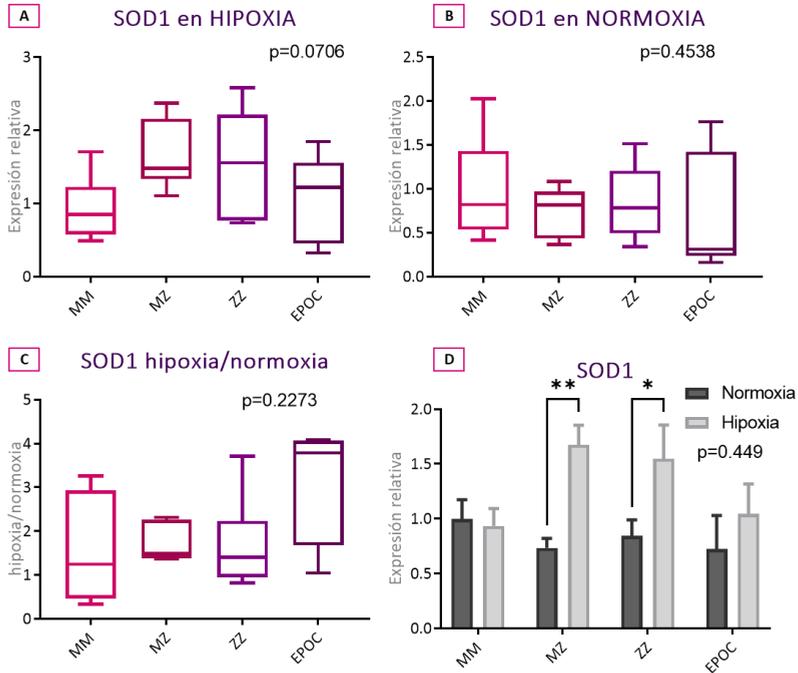


Figura 84. Niveles de expresión del gen que codifica para la SOD citosólica en los pacientes y en los controles en la edad adulta. Expresión a nivel de ARNm en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Sin embargo, cuando los pacientes ZZ se separaron según la ausencia o presencia de EPOC, se observaron diferencias entre los fenotipos en condiciones de hipoxia ($p=0,0272$). Los resultados mostraron aumento en la expresión de la SOD2 en los pacientes ZZ con EPOC, respecto a los controles sanos MM sin EPOC ($p=0,0246$), así como con los EPOC ($p=0,0451$) incubados en hipoxia (Figura 85A). No se observaron diferencias significativas entre los fenotipos bajo condiciones de normoxia ($p=0,3911$) (Figura 85B). Las comparaciones en la expresión en cuanto a la *ratio* hipoxia/normoxia, no mostraron diferencias significativas entre los fenotipos ($p=0,2451$) (Figura 85C); sin embargo, al comparar en cada grupo de estudio la expresión en hipoxia frente a la normoxia, se observaron diferencias significativas en los pacientes ZZ con EPOC ($p=0,0123$) (Figura 85D).

RESULTADOS

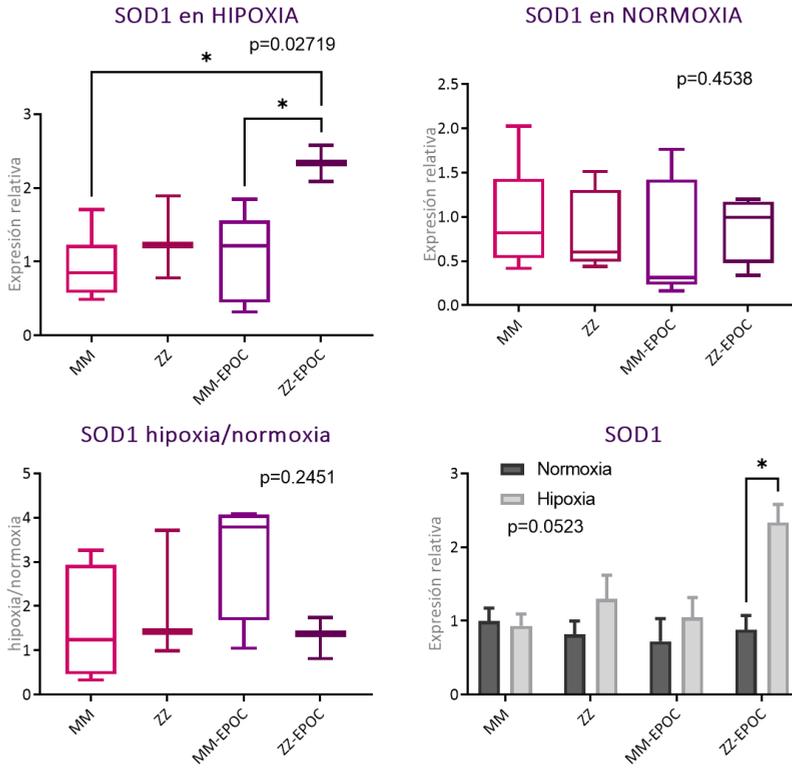


Figura 85. Niveles de expresión del gen que codifica para la SOD citosólica en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta. Expresión a nivel de ARNm en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Como en los casos anteriores, se estudiaron las posibles diferencias en la expresión génica de enzimas antioxidantes entre los neutrófilos extraídos previamente a la administración de la terapia de reposición en los pacientes ZZ y tras 5 días de dicho tratamiento. En cuanto a la expresión génica de la enzima SOD1 en los neutrófilos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los análisis comparativos realizados (Figura 86).

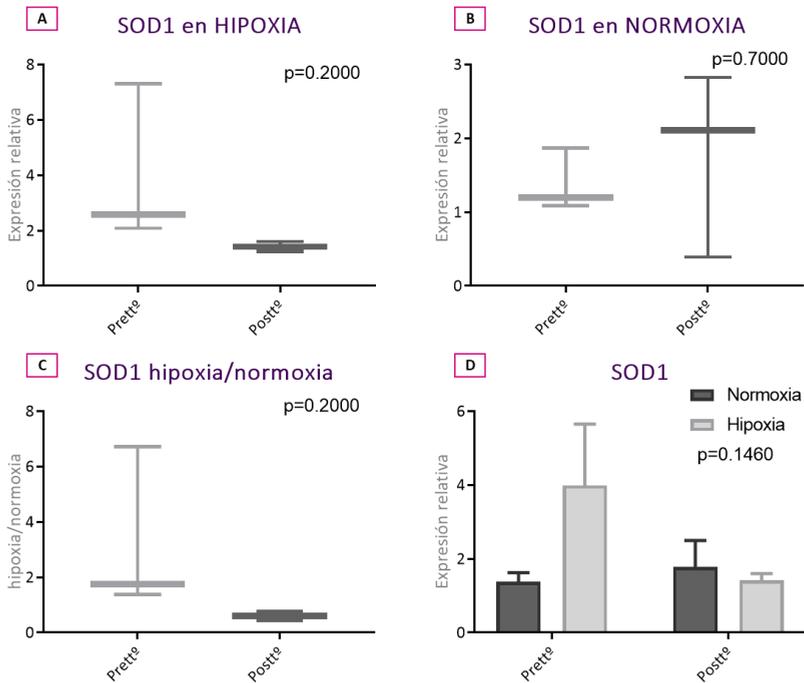


Figura 86. Niveles de expresión del gen que codifica para la SOD citosólica en pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de O_2^- mitocondrial en neutrófilos de pacientes ZZ antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

En referencia a la expresión de SOD2, o mitocondrial, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los análisis realizados cuando los pacientes se distribuyen únicamente por su fenotipo (Figura 87).

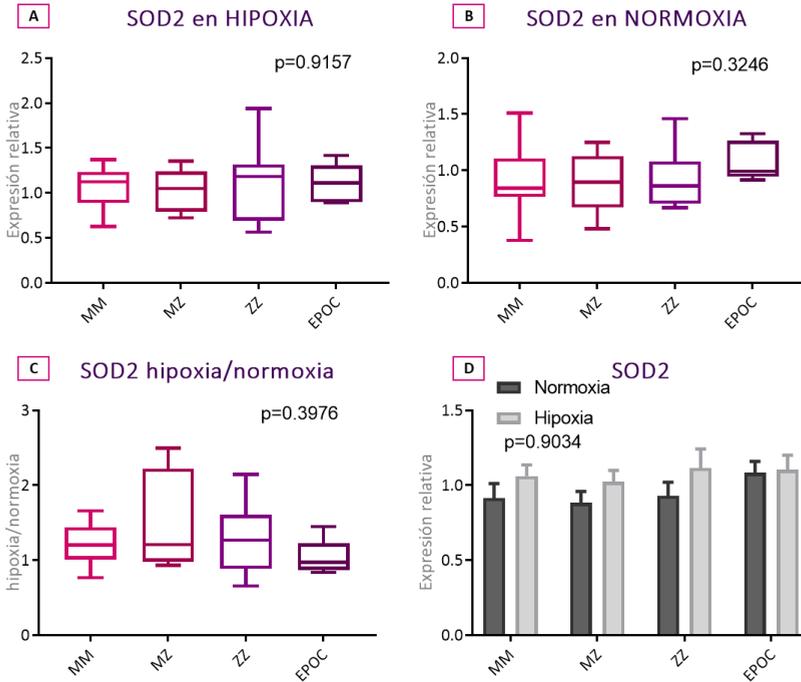


Figura 87. Niveles de expresión del gen que codifica para la SOD mitocondrial en los pacientes y en los controles en la edad adulta. Expresión a nivel de ARNm en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Al separar a los pacientes según ausencia o presencia de EPOC, o por su respuesta a hipoxia frente a normoxia, tampoco se consiguió ver diferencias entre los fenotipos (Figura 88). No obstante, en ambas situaciones, la expresión de SOD2 bajo condiciones de hipoxia es mayor que bajo condiciones de normoxia en cada uno de los grupos de estudio MM, MZ, SZ, ZZ y MM-EPOC, a pesar de no alcanzar significación estadística ($p=0,9034$) (Figura 87D y 88D).

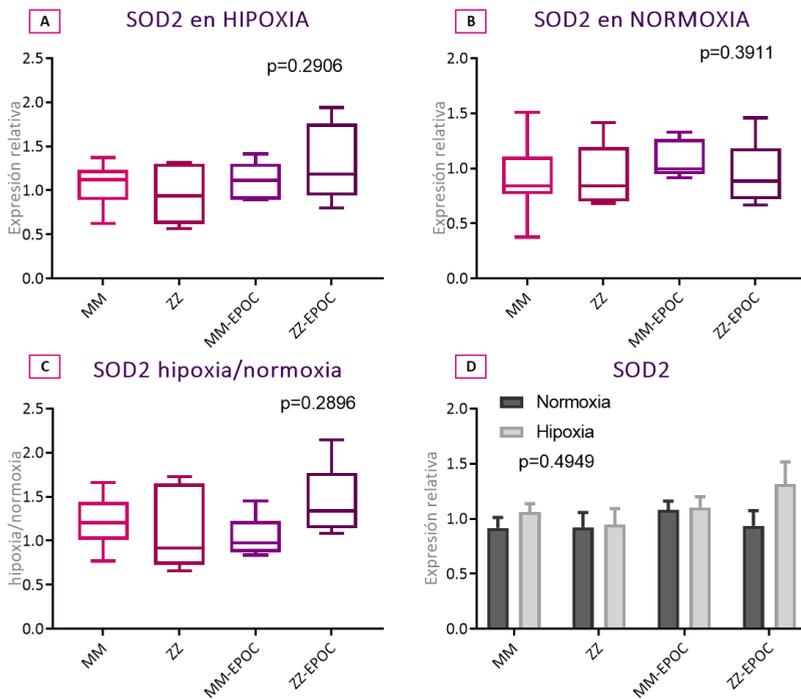


Figura 88. Niveles de expresión del gen que codifica para la SOD mitocondrial en los pacientes ZZ, con o sin EPOC y en los controles en edad adulta. Expresión a nivel de ARNm en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

RESULTADOS

En relación a la expresión de la enzima SOD2 en los neutrófilos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los análisis comparativos realizados respecto al efecto de la terapia de reposición (Figura 89). No obstante, cabe destacar que, tanto en las muestras extraídas antes de iniciar el tratamiento, como las obtenidas a los 5 días del mismo, la expresión génica de SOD2 resultó mayor bajo condiciones de hipoxia que de normoxia, aunque las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas ($p=0,2565$) (Figura 89D).

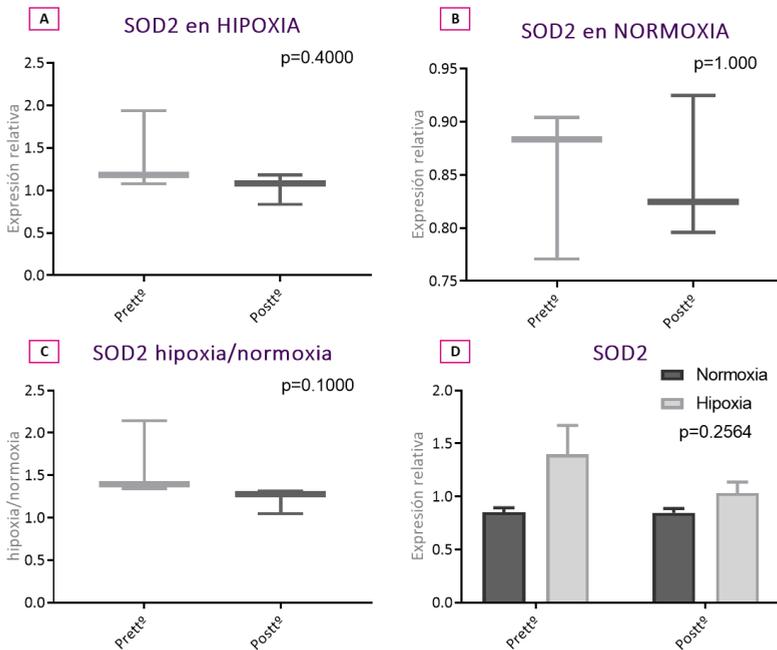


Figura 89. Niveles de expresión del gen que codifica para la SOD mitocondrial en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de O_2^- mitocondrial en neutrófilos de pacientes ZZ antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

RESULTADOS

Los análisis comparativos realizados para evaluar la expresión del factor de transcripción Nrf2 no revelaron diferencias significativas ni en condiciones de hipoxia ($p=0,2607$), ni normoxia ($p=0,7734$) (Figura 90A y 90B). Tampoco se observaron diferencias significativas entre fenotipos en el cociente de la expresión en hipoxia respecto a normoxia ($p=0,5279$) (Figura 90C). Se puede observar un ligero incremento en la expresión de este factor de transcripción bajo condiciones de hipoxia frente a la media de los valores obtenidos bajo condiciones de normoxia en los voluntarios MM, y en los pacientes MZ, ZZ y MM-EPOC, aunque no llegan a ser diferencias estadísticamente significativas ($p=0,5757$) (Figura 90D).

RESULTADOS

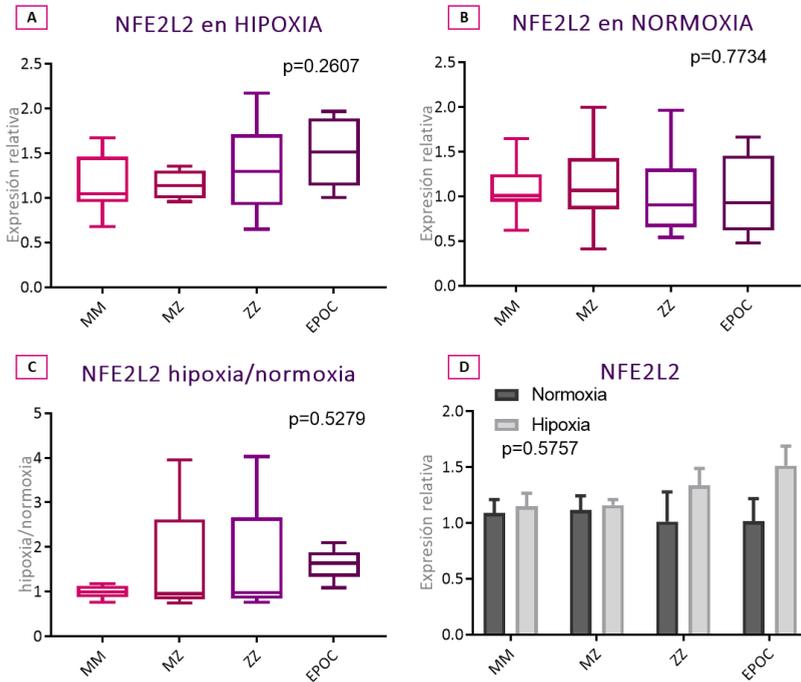


Figura 90. Niveles de expresión del gen que codifica para el factor de transcripción Nrf2 en los neutrófilos de los pacientes y en los controles en edad adulta. Expresión a nivel de ARNm en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Al separar a los pacientes según ausencia o presencia de EPOC, tampoco se observaron diferencias entre los fenotipos, ni en la comparación hipoxia frente a normoxia (Figura 91). De igual manera que en el análisis anterior, a pesar de no llegar a ser diferencias estadísticamente significativas ($p=0,5553$), se puede observar que la expresión en cada fenotipo es mayor bajo condiciones de hipoxia que de normoxia (Figura 91D).

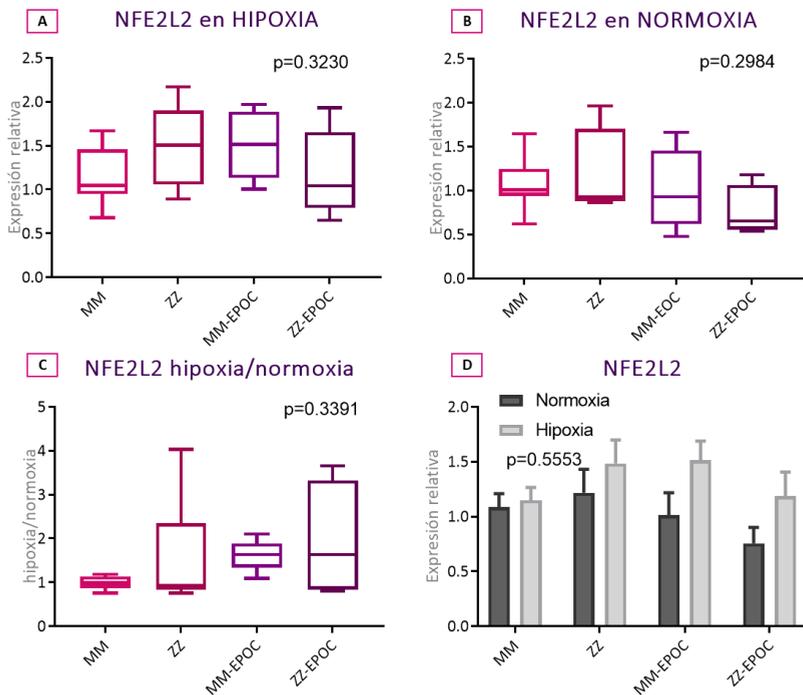


Figura 91. Niveles de expresión del gen que codifica para el factor de transcripción Nrf2 en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta. Expresión a nivel de ARNm en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. $*=p<0.05$ $**=p<0.01$, $***=p<0.001$.

RESULTADOS

En relación a la expresión génica del factor de transcripción Nrf2 en los neutrófilos, los análisis comparativos no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 92).

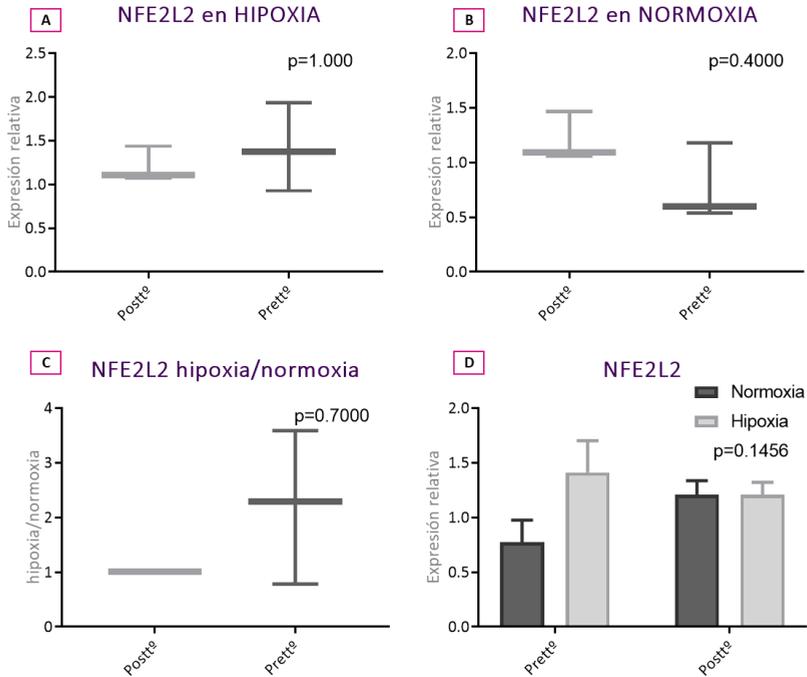


Figura 92. Niveles de expresión del gen que codifica para el factor de transcripción Nrf2 en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de O_2^- mitocondrial en neutrófilos de pacientes ZZ antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Los resultados no mostraron diferencias significativas en la expresión a nivel del ARNm en condiciones de hipoxia ($p=0,5361$), sin embargo, la expresión de Cat en los pacientes MZ, ZZ y también MM-EPOC son ligeramente mayores que los de los controles MM (Figura 93A). No se observaron diferencias significativas entre los fenotipos bajo condiciones de normoxia ($p=0,1858$) (Figura 93B). Tampoco en el cociente hipoxia/normoxia ($p=0,5547$) (Figura 93C), ni en la comparación entre las medias de expresión obtenidas en cada grupo, en hipoxia y normoxia ($p=0,2456$) (Figura 93D). Sin embargo, se observa que en los pacientes MZ, ZZ y MM-EPOC la expresión en hipoxia es mayor que en normoxia (Figura 93D).

RESULTADOS

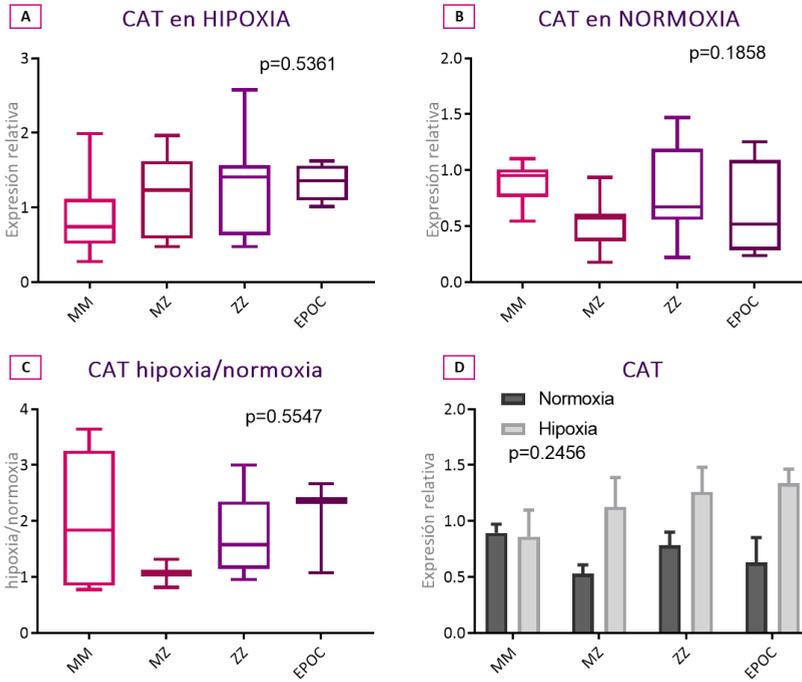


Figura 93. Niveles de expresión del gen que codifica para la CAT en los pacientes y en los controles en edad adulta. Expresión a nivel de ARNm en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Al separar a los pacientes según ausencia o presencia de EPOC, tampoco se observaron diferencias entre los fenotipos, ni en la comparación de hipoxia frente a normoxia (Figura 94). No obstante, la expresión de CAT es mayor en condiciones de hipoxia que en condiciones de normoxia en los grupos de pacientes MZ, ZZ y EPOC, a pesar de no llegar a alcanzar significación estadística ($p=0,2211$) (Figura 94D).

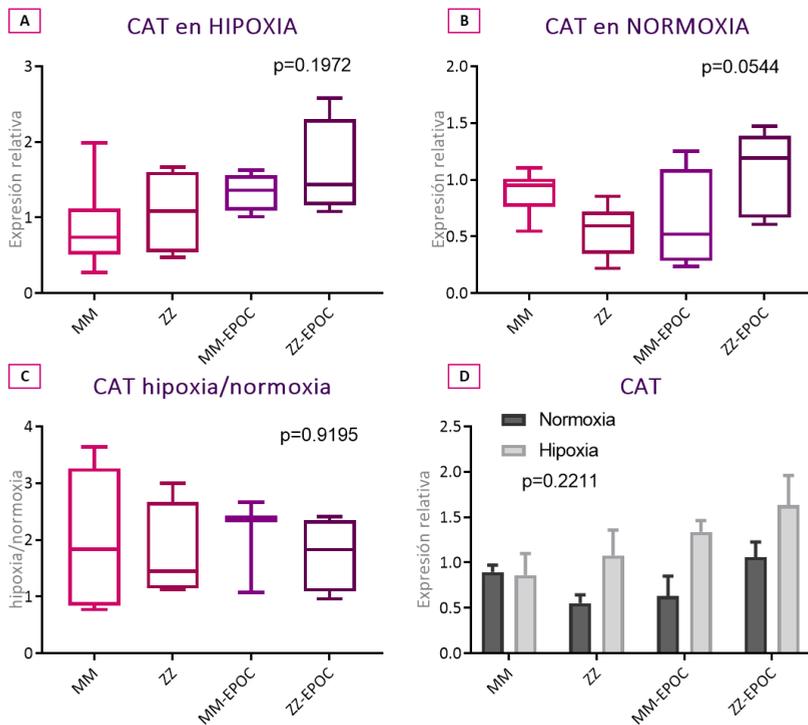


Figura 94. Niveles de expresión del gen que codifica para la CAT en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta. Expresión a nivel de ARNm en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. $*=p<0.05$ $**=p<0.01$, $***=p<0.001$.

RESULTADOS

En cuanto a la expresión génica de la enzima CAT en los neutrófilos, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los análisis comparativos realizados para valorar el efecto del tratamiento (Figura 95).

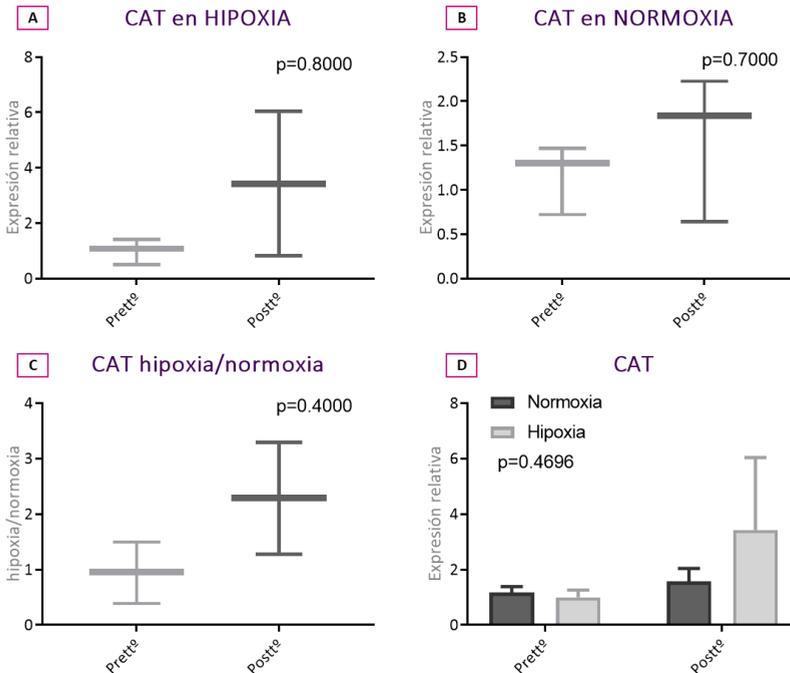


Figura 95. Niveles de expresión del gen que codifica para la CAT en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de O_2^- mitocondrial en neutrófilos de pacientes ZZ antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

RESULTADOS

Respecto a la expresión de GPX1 por los neutrófilos, se encontraron diferencias significativas entre los fenotipos bajo condiciones de hipoxia ($p=0,0156$). Los neutrófilos de los pacientes ZZ mostraron mayores niveles de expresión génica en comparación con los MM bajo condiciones de hipoxia ($p=0,0150$) (Figura 96A). Asimismo, se detectaron diferencias entre los fenotipos en el cociente hipoxia/normoxia ($p=0,0200$) (Figura 96C), que no existían en cambio, bajo condiciones de normoxia ($p=0,1054$) (Figura 96B). Por el contrario, la comparación en la expresión bajo hipoxia o normoxia, mostró diferencias significativas en los pacientes ZZ ($p=0,0019$), mientras que en el resto de grupos de estudio MM, MZ y MM-EPOC estas diferencias no llegaron a alcanzar significación estadística ($p=0,0961$) (Figura 96D).

RESULTADOS

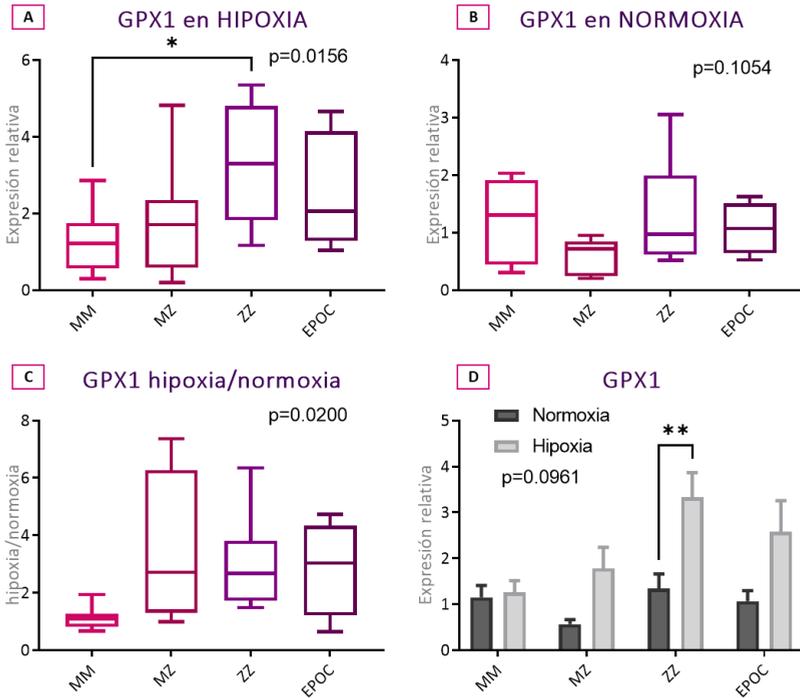


Figura 96. Niveles de expresión del gen que codifica para la glutatión peroxidasa en los pacientes y en los controles en edad adulta. Expresión a nivel de ARNm en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Al distribuir a los pacientes según ausencia o presencia de EPOC, se observaron, de nuevo, diferencias significativas entre los grupos de estudio ($p=0,0017$) respecto a la expresión de la GPX1 bajo condiciones de hipoxia. En este caso, los pacientes ZZ con EPOC expuestos a hipoxia, presentaban niveles aumentados de ARNm de GPX1, en comparación con los voluntarios sanos MM ($p=0,0013$) y los pacientes ZZ sin EPOC ($p=0,0414$) (Figura 97A). Por otro lado, el cociente entre los valores en hipoxia, normalizados según la normoxia, llegó a alcanzar significación estadística ($p=0,0587$), a pesar de experimentar todos ellos un incremento (Figura 97C). Por el contrario, al comparar los niveles de expresión en cada grupo, en los pacientes ZZ con EPOC existían diferencias significativas entre los obtenidos en hipoxia y en normoxia ($p=0,0022$). El resto de valores se encontró también ligeramente aumentado en los pacientes (Figura 97D).

RESULTADOS

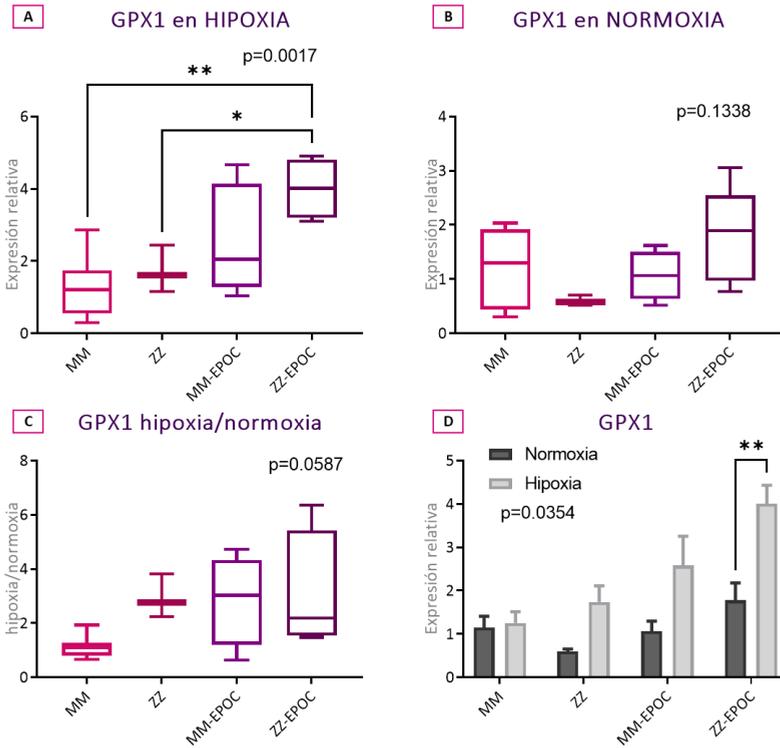


Figura 97. Niveles de expresión del gen que codifica para la GPX1 en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta. Expresión a nivel de ARNm e en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

En referencia a la expresión génica de la enzima GPX1 en los neutrófilos no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los análisis comparativos realizados (Figura 98).

RESULTADOS

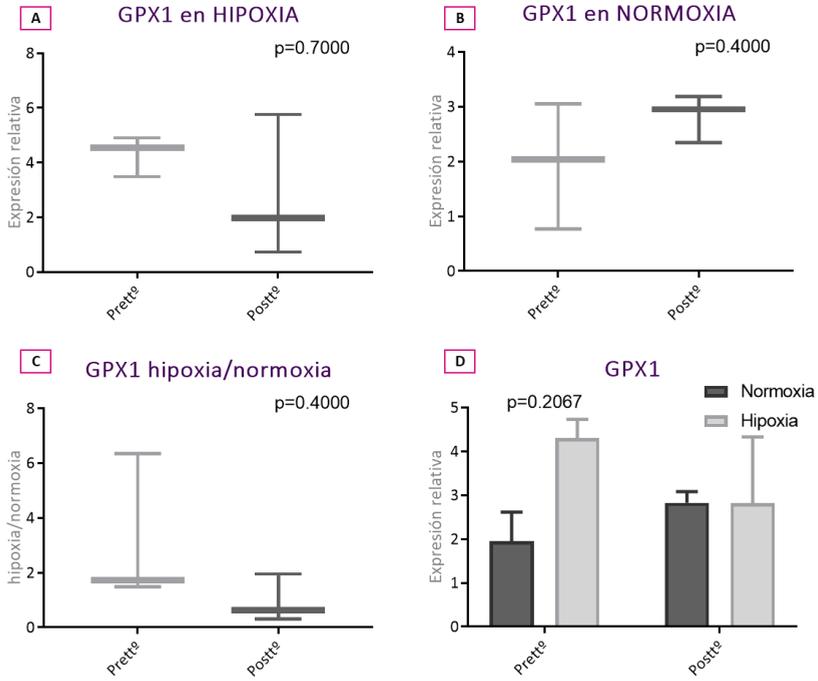


Figura 98. Niveles de expresión del gen que codifica para la GPX1 en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de O_2^- mitocondrial en neutrófilos de pacientes ZZ antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Los niveles de expresión de la GR a nivel de ARNm en condiciones de hipoxia mostró diferencias significativas entre los fenotipos ($p=0,0025$). Las pruebas de análisis múltiple encontraron diferencias significativas entre los pacientes MM con EPOC y el resto de los grupos de estudio, MM ($p=0,0386$), MZ ($p=0,0052$), y ZZ ($p=0,0023$) (Figura 99A). Los análisis comparativos respecto al cociente hipoxia/normoxia entre los fenotipos, no mostró diferencias significativas ($p=0,0747$) (Figura 99C). Éstas solo se encontraron, entre los niveles de expresión obtenidos en hipoxia y normoxia, en los pacientes MM con EPOC ($p=0,0002$) y, aunque -en el resto de grupos- las diferencias no fueron significativas ($p=0,0093$), la expresión en hipoxia también era ligeramente mayor que bajo condiciones de normoxia (Figura 99D).

RESULTADOS

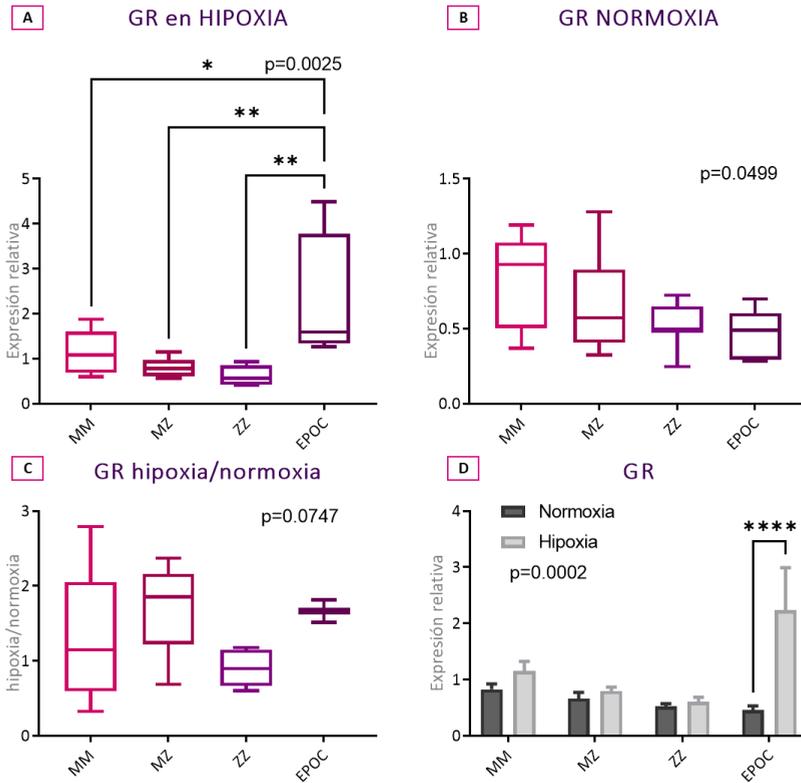


Figura 99. Niveles de expresión del gen que codifica para la glutatión reductasa en pacientes y controles en edad adulta. Expresión a nivel de ARNm en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

Cuando los pacientes ZZ se distribuyeron según presentaran, o no, EPOC, de nuevo, sólo se observaron, diferencias en la expresión de GR, entre los pacientes EPOC incubados en hipoxia frente a normoxia ($p=0,0010$) (Figura 100).

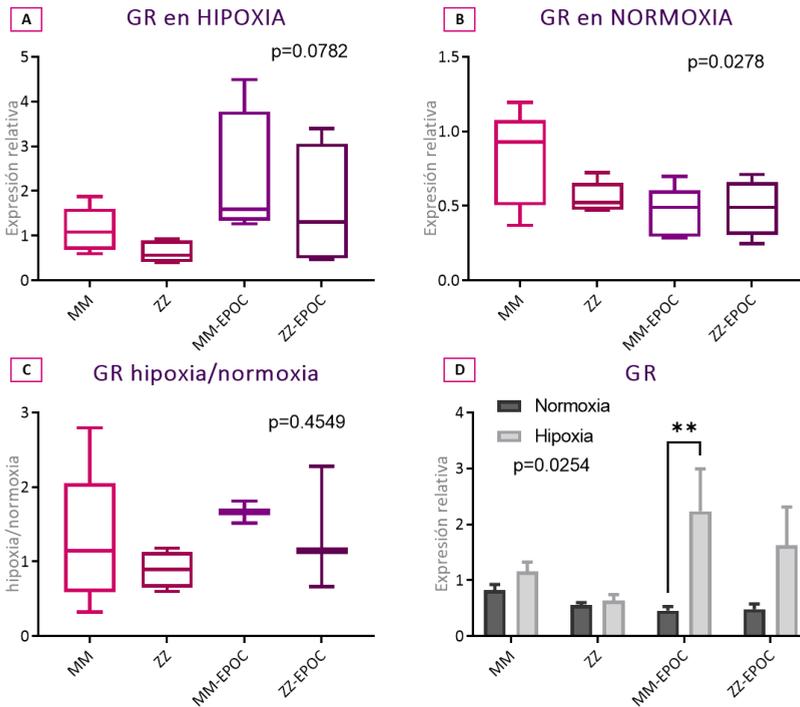


Figura 100. Niveles de expresión del gen que codifica para la GR en los pacientes ZZ con o sin EPOC y en los controles en edad adulta. Expresión a nivel de ARNm en neutrófilos A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

RESULTADOS

En relación a la expresión génica de la enzima GR en los neutrófilos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los análisis comparativos realizados (Figura 101).

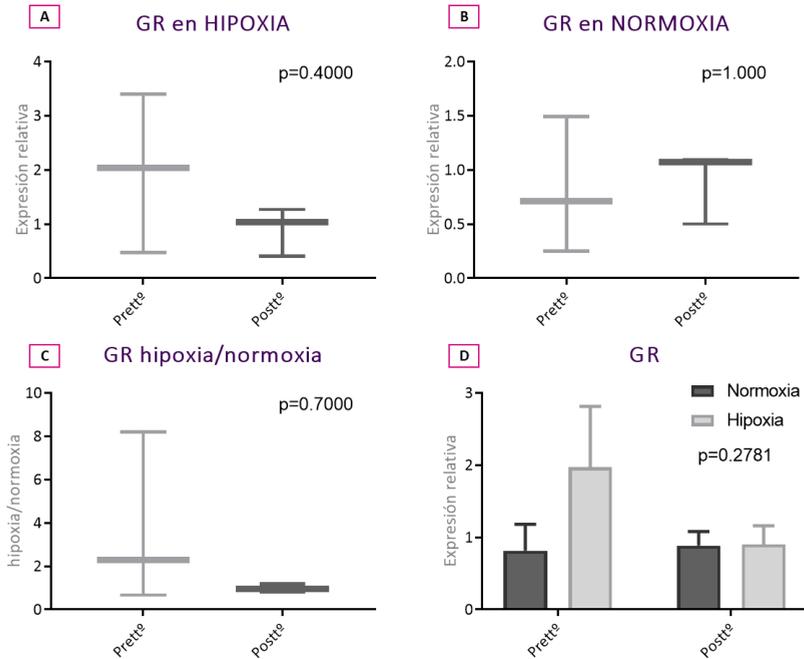


Figura 101. Niveles de expresión del gen que codifica para la GR en los pacientes ZZ con terapia de reposición. Determinación de la presencia de O_2^- mitocondrial en neutrófilos de pacientes ZZ antes y a los 5 días de la administración del tratamiento A) en condiciones de hipoxia, B) en condiciones de normoxia, C) cociente hipoxia frente a normoxia, D) representación de las medias en hipoxia y normoxia. *= $p<0.05$ ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$.

5. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los pacientes con DAAT presentan una gran variabilidad en cuanto a la gravedad de los síntomas que padecen, no siendo suficientes ni los niveles plasmáticos de AAT, ni el fenotipo, para identificar a aquellos que van a desarrollar enfermedad pulmonar o hepática grave. Por lo tanto, deben de existir otros factores de riesgo involucrados en la progresión de la enfermedad que ayuden a comprender esa variabilidad. Este trabajo estudia el comportamiento de los neutrófilos, célula clave dentro de la enfermedad, bajo condiciones de hipoxia. En él, se han abordado tres grandes bloques: degranulación, producción y secreción de citoquinas proinflamatorias, así como el perfil oxidativo de los neutrófilos procedentes de los pacientes con DAAT, de los pacientes con EPOC no asociada al DAAT y de controles sanos, tanto en niños como en adultos, con el objetivo de estudiar sus posibles implicaciones en la fisiopatología de la enfermedad.

Como se ha explicado anteriormente, los neutrófilos aislados de cada paciente se dividieron en dos bloques: una parte fue cultivada bajo condiciones de hipoxia y la otra, bajo condiciones de normoxia, lo cual ha facilitado la realización de diferentes tipos de análisis que aportan distinta información acerca del comportamiento de estas células en los pacientes con DAAT. Por un lado, este trabajo hemos podido concretar los niveles obtenidos en cualquiera de los grupos de estudio, respecto a cada uno de los parámetros evaluados, lo que -a su vez-, ha permitido comparar los recogidos en los pacientes con DAAT, con los individuos sanos y, en el caso de las muestras procedentes de adultos, con los de los pacientes con EPOC no asociada

DISCUSIÓN

al DAAT. Por otro lado, el cociente entre los niveles de cada parámetro bajo condiciones de hipoxia, y los obtenidos bajo condiciones de normoxia, ha servido para estudiar cómo afecta la hipoxia a cada uno de los grupos de estudio, y si lo hace de forma diferente. A su vez, la comparación entre las medias de los valores recogidos en hipoxia y normoxia, han permitido observar las posibles diferencias producidas al incubar los neutrófilos en, o sin, hipoxia. Estos planteamientos surgen, tal como se ha comentado en la justificación del estudio, ante la importante relevancia fisiológica que la hipoxia tiene para los neutrófilos, lo que ha hecho que consideráramos necesario observar el comportamiento de dichas células bajo concentraciones bajas de O₂.

5.1. Consideraciones generales de la muestra

Cabe destacar que este trabajo estudia una condición rara e infradiagnosticada, por lo que uno de los principales problemas que se plantean en este estudio fue conseguir reclutar un número suficiente de pacientes para lograr poder estadístico en todos los test realizados. El cálculo del tamaño muestral necesario para alcanzar un nivel de confianza del 95%, con un error alfa de 0,05 y un error beta de 0,10 se estimó en 20 pacientes por grupo. En el estudio se incluyeron, por un lado, a 7 voluntarios sanos MM, 31 pacientes MZ, 8 pacientes SZ y 15 pacientes ZZ en edad pediátrica y, por otro lado, a 15 voluntarios sanos MM, 5 pacientes con EPOC no asociado al DAAT, 9 pacientes MZ, 6 pacientes ZZ sin EPOC y 5 pacientes ZZ con EPOC. Por otra parte, esta tesis doctoral se ha realizado en época de pandemia por COVID, por lo

DISCUSIÓN

que durante más de 2 años no ha sido posible reclutar pacientes ni voluntarios sanos de los hospitales colaboradores.

Por todo ello, ciertos parámetros no han podido ser determinado (especialmente en voluntarios sanos) y, en muchos casos, aunque se observa una tendencia clara, no se ha llegado a obtener significación estadística, probablemente por el bajo número de muestras disponibles.

Los análisis comparativos no mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio respecto a edad y sexo, aunque -como era de esperar-, se encontraron diferencias en cuanto a los niveles de AAT, tanto en niños como en adultos. Por lo que respecta a los datos clínicos, en el caso de los niños, tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos de pacientes en lo referente a su función pulmonar y hepática (Tabla 5), mientras que -en el caso de los adultos-, a pesar de no encontrar diferencias en la función hepática entre los distintos grupos de pacientes, aquellos que tenían una EPOC asociada al DAAT, presentaban una función pulmonar alterada (Tabla 6).

Como ya se ha mencionado, el objetivo al incluir participantes en edad pediátrica, es el hecho de que uno de los parámetros estudiados, el estrés oxidativo, está influenciado por la edad y por otros factores exógenos como el consumo de alcohol y tabaco. La inclusión de un grupo pediátrico, nos permitía reducir, o incluso anular, el efecto de estos posibles factores de confusión en el estudio y, como se observa en los resultados, poder alcanzar significación

DISCUSIÓN

estadística en la mayoría de los análisis realizados; lo que en el grupo de edad adulta es más dificultoso. Además de la edad y los hábitos de salud nocivos, existen otros factores de confusión como los tratamientos de los pacientes, concomitantes a la terapia de reposición. Respecto a los niños, algunos de ellos habían presentado episodios de asma, y recibido algún tipo de tratamiento como los corticoides. De manera similar algunos de los adultos, recibían también otros tratamientos o eran fumadores, lo cual complica la interpretación de los resultados. Algunos datos dietéticos como el consumo de alcohol no fueron registrados, aunque somos conscientes de que podrían afectar a los resultados del estudio. Todos estos factores de confusión no han sido tenidos en cuenta a la hora de analizar los resultados debido al, ya comentado, bajo tamaño muestral.

5.2. Efecto de la hipoxia en la viabilidad celular de neutrófilos procedentes de pacientes DAAT

Entre las múltiples funciones de la AAT, ya explicadas anteriormente, cabe destacar aquí su papel antiapoptótico. A este hecho debemos sumar el que la ZZ-AAT mal plegada, es disfuncional y, por ganancia de función se acumula en el RE de los neutrófilos, creando estrés del RE lo que conlleva un aumento de la apoptosis de estas células (señales apoptóticas incluyendo vías del TNF- α); es decir, la AAT podría regular la apoptosis neutrofílica (109), la cual se puede revertir con la terapia de reposición. La apoptosis o muerte celular

DISCUSIÓN

programada de los neutrófilos constituye un mecanismo de resolución de la inflamación; sin embargo, los pacientes DAAT tienen este mecanismo alterado, agravando el proceso inflamatorio.

En nuestro estudio hemos observado que, bajo condiciones de hipoxia, las células procedentes de pacientes en edad pediátrica no sufrían cambios en su viabilidad celular, a pesar de que, en todos los grupos de pacientes la media fue menor que en los controles (Figura 8A). Sin embargo, la viabilidad de los neutrófilos procedentes de los adultos ZZ, con alto riesgo de desarrollar enfermedad, disminuían significativamente respecto a los de los pacientes MZ ($p=0,0279$) (Figura 9A), que presentan un riesgo intermedio de sufrir algún tipo de daño. Asimismo, cuando se analizaron los resultados separando a los pacientes ZZ según la presencia o ausencia de EPOC, se observó que todos los pacientes (individuos ZZ, con o sin EPOC, y los pacientes con EPOC no asociada al DAAT) presentaban una menor viabilidad celular que los individuos sanos MM, aunque las diferencias no llegaban a ser estadísticamente significativas ($p=0,3066$).

5.3. Efecto de la hipoxia en la degranulación de los neutrófilos procedentes de los pacientes con DAAT

En las muestras procedentes de niños, los resultados en los diferentes grupos de estudio, muestran diferencias significativas entre los pacientes con DAAT y los controles, tanto en la actividad de las

DISCUSIÓN

enzimas EN ($p=0,0632$; Figura 12A) y MPO ($p=0,0402$; Figura 13A) como en la cantidad de lactoferrina ($p=0,0044$; Figura 14A) y MMP-9 ($p=0,0013$; Figura 15A), detectada en el sobrenadante del cultivo de los neutrófilos incubados en condiciones de hipoxia y estimulados posteriormente con la combinación de TNF- α y fMLP. En todos los casos los pacientes ZZ, con mayor riesgo de desarrollar enfermedad pulmonar y hepática, presentaban, en los neutrófilos sometidos a condiciones de hipoxia, un aumento significativo de los marcadores de degranulación de los diferentes gránulos (EN, MPO, lactoferrina y MMP-9) respecto al grupo control.

Por otro lado, se estudió el efecto de la hipoxia en los distintos fenotipos, mediante análisis comparativos del cociente entre los niveles obtenidos en los neutrófilos de cada paciente, bajo condiciones de hipoxia y normoxia. Este análisis nos permite estudiar si existen diferencias entre los grupos de estudio en cuanto al comportamiento en la liberación de cada tipo de gránulo. En todos los parámetros estudiados los neutrófilos ZZ, que presentan mayor riesgo de desarrollar enfermedad, están más afectados por la hipoxia que el resto de grupos de estudio, ya que presentan *ratios* más elevadas que el resto de fenotipos, siendo las diferencias en la liberación de MPO ($p=0,0076$) y MMP-9 ($p=0,0073$) estadísticamente significativas (Figura 12C, 13C, 14C y 15C).

Además, dentro de cada grupo establecido por fenotipo, se evaluaron las diferencias existentes entre los valores obtenidos en hipoxia y normoxia. Para ello, se compararon los niveles medios de las proteínas liberadas al sobrenadante de los cultivos en condiciones de

DISCUSIÓN

hipoxia y normoxia en cada uno de los grupos de estudio (no es una comparación entre fenotipos, sino dentro de cada uno de ellos). Los resultados indicaron diferencias significativas en la liberación de MPO por parte de los neutrófilos ZZ en hipoxia respecto a la normoxia ($p=0,0116$) (Figura 13D)). De igual manera, en el resto de marcadores estudiados (EN, lactoferrina y MMP-9), se observa un aumento de la liberación de proteína por los neutrófilos ZZ en hipoxia comparado con normoxia, aunque la diferencia no llega a alcanzar significación estadística (Figura 12D, 14D y 15D). Lo mismo ocurre respecto a la liberación de gránulos primarios (EN y MPO), en el resto de los pacientes con DAAT, MZ y SZ (Figura 12D y 13D).

En cuanto a las muestras procedentes de adultos, debido al menor tamaño muestral respecto a las procedentes de niños y los factores de confusión comentados anteriormente, no fue posible encontrar resultados estadísticamente significativos en muchos de los exámenes realizados. Los análisis comparativos mostraron diferencias significativas en los niveles de MPO, siendo la liberación de dicha proteína bajo condiciones de hipoxia, mayor en los pacientes ZZ ($p=0,0006$) y en las EPOC no asociadas al DAAT ($p=0,0025$) respecto a los controles MM (Figura 21A). Asimismo, al separar a los pacientes ZZ según la presencia de EPOC, observamos un incremento significativo en la actividad de la MPO en los sujetos con EPOC y, dentro de estos últimos, mayor en los ZZ-EPOC ($p=0,0029$; Figura 22A). Cuando los pacientes se distribuyeron por fenotipo, la liberación de MMP-9 fue significativamente mayor en los que tenían EPOC no asociada al DAAT ($p=0,0016$), que en los que únicamente padecían DAAT, respecto a los

DISCUSIÓN

controles MM (Figura 27A), cabe destacar que los niveles en los pacientes ZZ fueron ligeramente superiores a los controles MM. Igualmente, al distribuir los grupos según la presencia de EPOC, los sujetos con EPOC no asociada al DAAT presentaron niveles significativamente aumentados respecto al resto de grupos ($p=0,0199$; Figura 28A). Además, se observó, de nuevo, un ligero incremento en la liberación de la proteína MMP-9 en los pacientes ZZ con EPOC, respecto a los controles MM y a los ZZ sin EPOC (Figura 28A).

En relación a los parámetros de degranulación, no se encontraron diferencias significativas al comparar el cociente entre los valores obtenidos, en los neutrófilos procedentes de cada adulto, en hipoxia y normoxia. Sin embargo, el cociente de la actividad EN mostró un ligero aumento en los pacientes ZZ (con y sin EPOC) y los MM-EPOC, respecto a los controles MM sanos (Figura 18C y 19C).

Por lo que respecta a las diferencias entre la liberación de proteínas bajo condiciones de hipoxia y normoxia, en cada grupo de estudio, a pesar de no llegar a alcanzar la significación estadística, se observan ciertas diferencias en la degranulación. Tanto los neutrófilos de los pacientes que sufren EPOC, asociada -o no- al DAAT como los de los MZ, incubados bajo condiciones de hipoxia, presentan un ligero incremento de la actividad EN y de la cantidad de lactoferrina respecto a los incubados en normoxia (Figura 18D, 19D, 24D y 25D).

En referencia al efecto de la terapia de reposición sobre la degranulación, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los marcadores para cada gránulo (tanto bajo condiciones de

DISCUSIÓN

hipoxia como de normoxia), aunque se aprecia una tendencia al aumento en la liberación de MPO tras la terapia de reposición (Figura 23A y B). Lo más interesante es que, la liberación, de EN y lactoferrina, bajo condiciones de hipoxia es mayor que bajo condiciones de normoxia tanto antes como tras el tratamiento aumentativo (Figura 20D y 26D). Estos datos son muy interesantes desde el punto de vista clínico, ya que indican que la terapia de reposición no incrementa la degranulación de los neutrófilos, que, de producirse, podría potenciar el daño pulmonar causado por dichas células cuando se activan. No obstante, estos resultados hay que tomarlos con cautela, ya que han sido obtenidos en un bajo número de pacientes ($n=3$), por lo que es necesario ampliar el tamaño muestral para confirmar dichos hallazgos.

Por otro lado, se estudió la liberación de AAT, que se encuentra en los tres tipos de gránulos de los neutrófilos. Dichas células procedentes de pacientes DAAT (MZ, SZ y ZZ), presentaron, de acuerdo a su fenotipo, niveles disminuidos en la liberación de la proteína AAT al medio, al ser incubados tanto bajo condiciones de hipoxia como de normoxia. Sin embargo, el hallazgo más interesante fue que los neutrófilos de los pacientes ZZ, tanto en las muestras de edad pediátrica ($p=0,0034$; Figura 11C) como en las de adultos ($p=0,0322$; Figura 16C), presentan un cociente entre hipoxia y normoxia significativamente incrementado respecto a los controles sanos. Este hecho indica que el efecto que produce la hipoxia es mayor en los pacientes con DAAT que en los individuos sanos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas respecto a los pacientes MZ y SZ comparados con los controles sanos. Por otro lado, un estudio

DISCUSIÓN

reciente ha puesto de manifiesto que los niveles plasmáticos de AAT aumentan en los pacientes con EPOC y en la población general que sufre de otras afecciones respiratorias, no relacionados con el DAAT (157). Por lo tanto, uniendo este hecho a nuestros resultados, podríamos especular que el aumento de AAT podría ser un mecanismo de defensa frente al proceso inflamatorio en el pulmón.

Estudios previos ya observaron un aumento de la EN, en el ELF de los pacientes con DAAT (103) que -como se ha comentado anteriormente-es considerada una de las proteasas más importantes en cuanto a la actividad proteolítica en el pulmón, lo cual concuerda con nuestros resultados y con el hecho de que el número de neutrófilos sea mayor en el pulmón de los pacientes respecto a los individuos sanos, ya que la EN puede provocar la quimiotaxis de los neutrófilos.

Un estudio previo sobre los efectos del *priming* en la degranulación de los neutrófilos DAAT, han demostrado que estas células aisladas de pacientes con DAAT y función pulmonar disminuida ($FEV_1 < 80\%$), incubados bajo condiciones ambientales de O_2 ($21\% O_2$) y al ser estimulados con $TNF-\alpha$ y fMLP, liberan mayor cantidad de MPO (gránulos primarios) que los individuos sanos (58). En nuestro estudio observamos este mismo hallazgo bajo normoxia y también, bajo hipoxia ($1\% O_2$) donde las diferencias son mayores (Figura 22A y B). Cabe destacar que, en nuestro estudio demostramos que los neutrófilos de pacientes ZZ ya en edad pediátrica presentan los marcadores de degranulación aumentados respecto a los controles MM (Figura 12A, 13A, 14A, 15A). Además, estos mismos autores

DISCUSIÓN

demonstraron que la adición de AAT exógena puede modular la degranulación de los neutrófilos inducida por TNF- α y fMLP. El incremento en la liberación de MPO por los neutrófilos activados, tanto de voluntarios sanos como de pacientes con DAAT, se vio reducido en presencia de AAT exógena (58). También evaluaron el efecto de la terapia de reposición, comparando los valores obtenidos antes a y los 2 días de iniciar el tratamiento y observaron que dicha terapia modifica el proteoma del neutrófilo *in vivo*, con una disminución significativa de la MPO y la PR3 a los dos días del tratamiento (n=6 sujetos), mientras que nuestros resultados, * parecen indicar que existe un aumento de la MPO a los 5 días del tratamiento (Figura 23A y B), sin embargo, se necesita incrementar el tamaño muestral para aclarar estos resultados.

Otra cuestión a debatir es el efecto de la hipoxia en la degranulación de los neutrófilos. Existen estudios *in vitro* realizados en los neutrófilos procedentes de voluntarios sanos activados con agonistas diferentes al TNF- α , en los que la hipoxia producía un aumento en la liberación de EN, MPO, lactoferrina y MMP-9 respecto a los cultivados bajo condiciones de normoxia (136). Sin embargo, no se encontraron los mismos efectos al estimular los neutrófilos, aislados tras hipoxia con TNF- α junto a fMLP, que no parecen promover la degranulación de neutrófilos procedentes de voluntarios sanos (57,124,140). Nuestra investigación, de igual manera, no muestra diferencias entre hipoxia y normoxia dentro de los neutrófilos de voluntarios MM estimulados con TNF- α y fMLP. En conjunto, estos resultados sugieren que la hipoxia promueve la secreción de gránulos

DISCUSIÓN

azurófilos, específicos y gelatinosos, aunque la respuesta frente a la hipoxia varía según el entorno o *priming*.

La principal aportación de esta Tesis Doctoral al conocimiento actual sobre la degranulación de los neutrófilos DAAT, radica en que la hipoxia confiere un fenotipo neutrofílico mucho más agresivo, que podría incrementar el daño pulmonar. Además, la hipoxia, habitual en los focos de infección e inflamación (situación en la que se encuentra el pulmón de los pacientes con DAAT severo) (128,133), promueve dicha degranulación frente a las condiciones de normoxia en las que se han realizado los estudios previos con neutrófilos activados.

5.4. Efecto de la hipoxia en la producción y secreción de citoquinas por los neutrófilos procedentes de los pacientes con DAAT

El TNF- α es uno de los principales moduladores de la inflamación, ya que es capaz de regular su propia expresión génica (112) y al mismo tiempo la expresión de otras citoquinas inflamatorias, como la IL-8 (113). A su vez la expresión del TNF- α está regulada por la AAT, por lo que los pacientes ZZ presentan estas rutas de señalización alteradas (59).

En cuanto a los resultados del trabajo respecto a la producción y secreción de citoquinas proinflamatorias, se evaluó la presencia de IL-8 y TNF- α . Estudios previos han descrito que los neutrófilos ZZ liberan mayor cantidad de TNF- α que los neutrófilos procedentes de

DISCUSIÓN

individuos MM y que la terapia de reposición, de acuerdo con las propiedades antiinflamatorias de la AAT, puede reducir la expresión del TNF- α (59). También se han descrito niveles incrementados de IL-8 en el ELF de los pacientes con DAAT y deterioro funcional pulmonar leve respecto a los individuos sanos (103). Según lo esperado, en nuestro estudio la liberación de ambas citoquinas fue mayor en los neutrófilos de pacientes ZZ, con mayor riesgo de desarrollar enfermedad pulmonar y hepática, tanto bajo condiciones de hipoxia como de normoxia (Figura 30A, 30B, 32A y 32B).

En referencia al efecto de la hipoxia en los distintos fenotipos, mediante análisis comparativos del cociente entre los niveles obtenidos en los neutrófilos de cada paciente, bajo condiciones de hipoxia y normoxia. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la producción y liberación de citoquinas.

Sin embargo, el hallazgo más interesante fueron las diferencias observadas en los efectos de la hipoxia y normoxia sobre la liberación de estas citoquinas proinflamatorias dentro de cada grupo. Los neutrófilos procedentes de pacientes en edad pediátrica con fenotipo SZ ($p= 0,0370$) y ZZ ($p= 0,0001$), incubados bajo condiciones de hipoxia liberan más cantidad de IL-8 que los incubados bajo condiciones de normoxia y la misma observación se puede apreciar en los neutrófilos de pacientes ZZ adultos, aunque -en este caso-, las diferencias no llegaron a alcanzar la significación estadística ($p=0,8276$). Asimismo, los neutrófilos procedentes de adultos ZZ también liberaron mayor cantidad de TNF- α al medio de cultivo en

DISCUSIÓN

condiciones de hipoxia, en comparación a los incubados en normoxia ($p=0,8247$).

Diversos estudios realizados en ratones e individuos sanos, mantenidos en estancias a gran altitud, habían descrito que las condiciones de hipoxia podrían inducir la liberación de citoquinas proinflamatorias a nivel sistémico (131,132). Sin embargo, ciertos estudios *in vitro* realizados con neutrófilos aislados de voluntarios sanos bajo condiciones hipóxicas y estimulados con diferentes agonistas como PMA, PAF o GM-CSF, TNF- α o LPS, no mostraron diferencias significativas respecto a las condiciones de normoxia (124,136). Por ello, al comparar estos resultados con los obtenidos en este trabajo, podríamos que la hipoxia favorece la producción y secreción de citoquinas pro inflamatorias por los neutrófilos DAAT, pero que -al igual que para la degranulación-, la respuesta varía según el *priming*.

5.5. Efecto de la hipoxia en los niveles de calcio intracelular de los neutrófilos procedentes de los pacientes con DAAT

En cuanto a las medidas del Ca^{2+} intracelular en los neutrófilos incubados bajo condiciones de hipoxia no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio, ni en las muestras procedentes de niños, ni en las de los adultos (Figura 34A y 35A).

DISCUSIÓN

Los análisis comparativos tampoco mostraron diferencias significativas entre los fenotipos en lo referente al cociente entre los valores de Ca^{2+} bajo condiciones de hipoxia y de normoxia (Figura 34C y 35C). No obstante, respecto a las diferencias entre hipoxia y normoxia, dentro de cada grupo de estudio, en todos los casos, los niveles de Ca^{2+} intracelular son mayores bajo condiciones de hipoxia que de normoxia (tanto en los estudios divididos por fenotipo como por la presencia de EPOC) (Figura 34D, 35D y 36A), a pesar de no llegar a alcanzar significación estadística.

Por último, la terapia de reposición parece disminuir el Ca^{2+} intracelular tanto en condiciones de hipoxia ($p=0,2789$), como de normoxia ($p=0,0391$).

Por lo tanto, estos resultados indican que la hipoxia podría aumentar la cantidad de Ca^{2+} intracelular con sus consecuencias para la célula, aunque se necesitan más datos para establecer conclusiones claras.

5.6. Efecto de la hipoxia en el perfil oxidativo de los neutrófilos procedentes de los pacientes con DAAT

Cabe recordar que las especies reactivas están involucradas en diversos procesos entre los que se incluye la modulación de la respuesta inmune. Entre otras funciones, están implicadas en procesos como la quimiotaxis, adhesión, *rolling* y fagocitosis de los

DISCUSIÓN

neutrófilos; en la formación de NETS y, obviamente, en el estallido oxidativo (83). Sin embargo, deben encontrarse en equilibrio con el sistema antioxidante ya que una presencia excesiva o insuficiente de estas especies puede derivar en estrés oxidativo o reductivo respectivamente y en consecuencia patogenicidad.

5.6.1. Especies reactivas

En relación a las ROS, en los neutrófilos procedentes de niños, los resultados del estudio indican que, en condiciones de hipoxia, existen diferencias significativas en los niveles de ONOO^- ($p=2.168\text{e-}005$) y del H_2O_2 ($p=0,0027$) entre los grupos de estudio, siendo estos niveles estadísticamente mayores en los individuos ZZ respecto a los controles MM y también respecto a los pacientes MZ en ambos casos (Figura 38A y 39A). Asimismo, en cuanto a las RNS, se observaron diferencias significativas entre los distintos fenotipos y un incremento de la producción de NO en los pacientes ZZ en comparación con los pacientes MZ ($p=0,0301$), bajo condiciones de hipoxia (Figura 41A). En concordancia con estos resultados, un estudio previo de nuestro grupo de investigación concluyó que, a nivel sistémico, existe un aumento del H_2O_2 en el plasma de niños asintomáticos (116). En cuanto al daño oxidativo, los resultados de nuestro estudio muestran un daño oxidativo incrementado en los pacientes con DAAT respecto a los controles en la edad pediátrica. Se observó un aumento significativo de proteínas carboniladas tanto en los pacientes ZZ, como en los MZ y SZ, respecto al grupo control ($p=0,041$; Figura 44A) bajo condiciones de hipoxia. También se encontraron niveles de peroxidación lipídica

DISCUSIÓN

estadísticamente incrementados, en los pacientes ZZ respecto a los controles MM ($p=0,0283$; Figura 45A). Algunos estudios previos sobre estrés oxidativo en ratones Z muestran un incremento de ciertos marcadores de daño oxidativo en los lípidos, ADN y proteínas (niveles de MDA, 8-OHdG, proteínas carboniladas) (115). Asimismo, un estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación previamente, mostró un aumento significativo en marcadores de daño oxidativo en las células mononucleares circulantes de niños ZZ asintomáticos respecto a los controles sanos (118).

Por otro lado, en cuanto al estudio del cociente de cada parámetro en condiciones de hipoxia y normoxia para la producción de ROS y RNS no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las muestras procedentes de niños. En consecuencia, tampoco se observaron diferencias en los parámetros de daño oxidativo.

En referencia a los análisis comparativos del perfil oxidativo, en muestras procedentes de niños, medidos bajo condiciones de hipoxia y normoxia dentro de cada grupo de estudio, los neutrófilos ZZ incubados bajo condiciones de hipoxia mostraron valores incrementados de H_2O_2 respecto a los mismos incubados bajo condiciones de normoxia ($p=0,0178$; Figura 39D), aunque la diferencia observada en $ONOO^-$ no llegó a ser significativa ($p=0,9652$; Figura 38D).

En referencia a las muestras procedentes de adultos, como en el caso de la degranulación, el bajo tamaño muestral respecto a las procedentes de niños y los factores de confusión comentados

DISCUSIÓN

anteriormente, dificultó encontrar resultados estadísticamente significativos en muchos de los exámenes realizados. No se llegaron a encontrar diferencias significativas en la producción de ROS, aunque al igual que las muestras procedentes de niños ZZ asintomáticos, los pacientes ZZ adultos presentan niveles incrementados de ONOO^- y H_2O_2 respecto a los controles sanos bajo condiciones de hipoxia (Figura 46A, 47A 49A). Asimismo, las diferencias, entre los pacientes con DAAT adultos y los controles sanos en el daño oxidativo en las biomoléculas no alcanzaron significación estadística (Figura 64A, 65A, 67A y 68A), aunque los niveles de proteínas carboniladas se encuentran ligeramente aumentadas en los pacientes ZZ (Figura 64A y 65A).

Por lo que respecta a las diferencias en relación a la producción de especies reactivas bajo condiciones de hipoxia y normoxia, en cada grupo de estudio en las muestras de adultos, cabe destacar los niveles de NO que, en todos los casos, son mayores bajo condiciones de hipoxia que bajo condiciones de normoxia (tanto en los estudios divididos por fenotipo como por la presencia de EPOC) (Figura 55D).

Otro trabajo realizado con neutrófilos incubados bajo normoxia y activados (utilizando $\text{TNF-}\alpha$ junto fMLP), aislados de pacientes con DAAT y enfermedad de las vías respiratorias, recoge un incremento en la producción de O_2^- por parte de las células procedentes de voluntarios sanos (58). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en este parámetro de estudio para los individuos con EPOC, ni bajo normoxia ni bajo hipoxia.

DISCUSIÓN

Respecto a la función mitocondrial en las muestras de edad pediátrica, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio en cuanto a O_2^- mitocondrial y $\Delta\Psi_m$ (Figura 42 y 43). Por el contrario, en las muestras procedentes de adultos, se observaron diferencias significativas en el O_2^- mitocondrial entre los pacientes ZZ y los MZ bajo condiciones de hipoxia ($p=0,0197$; Figura 58A), y, a pesar de no ser estadísticamente significativo el O_2^- mitocondrial parecía ligeramente aumentado en los ZZ-EPOC respecto al resto de grupos de estudio bajo condiciones de hipoxia ($p=0,3321$), cuando estos se dividían según la función pulmonar (Figura 59A).

En cuanto al conocimiento del efecto de la hipoxia en el estrés oxidativo, estudios previos con neutrófilos aislados de voluntarios sanos e incubados en condiciones de hipoxia, tras ser estimulados con GM-CSF y fMLP, demuestran una reducción en la liberación de anión O_2^- en hipoxia (siendo este hecho independiente del estallido oxidativo que no se ve modificado) (124), lo cual concuerda con nuestros resultados en los que los neutrófilos -tanto de niños (Figura 40D) como de adultos (Figura 52D) MM-, incubados en hipoxia, a pesar de que no alcanzan significación estadística, presentan unos niveles de O_2^- ligeramente disminuidos en comparación con los encontrados en normoxia. Sin embargo, la producción de anión O_2^- se encuentra aumentada en los neutrófilos extraídos (estimulados con PAF junto a fMLP) de sujetos sanos tras ser sometidos a hipoxemia (136), quizás debido a la reoxigenación.

Finalmente, en referencia al efecto de la terapia de reposición sobre las especies reactivas, no se llegaron a encontrar diferencias

DISCUSIÓN

estadísticamente significativas en los análisis realizados debido al reducido número de pacientes con DAAT sometidos a esta terapia en los hospitales que participan en el presente estudio. No obstante, se pueden apreciar ciertas tendencias a la reducción de las especies reactivas, tanto del oxígeno (ONOO^- , H_2O_2 , O_2^-) como del nitrógeno (NO) (Figura 48A, 51A, 54A, 57A).

Por lo tanto, la principal conclusión que podemos extraer de estos resultados es que los neutrófilos de los pacientes ZZ, con alto riesgo de desarrollar enfermedad pulmonar y hepática, presentan niveles incrementados de estrés oxidativo. Por otro lado, la hipoxia podría afectar la producción de ciertas especies reactivas como el H_2O_2 o el NO. Finalmente, nuestros resultados indican que la terapia de reposición podría reducir la producción de especies reactivas.

5.6.2. Efecto de la hipoxia en la defensa antioxidante de los neutrófilos procedentes de los pacientes con DAAT

En cuanto a la defensa antioxidante no enzimática, no existe un consenso claro dentro de la enfermedad. Por un lado, un estudio previo en ratones PiZ encontró un aumento de la relación GSH/GSSG (cambio reductivo) y una mayor cantidad de GSH total en el RE, mientras que no observaron diferencias significativas a nivel citoplasmático en estos ratones transgénicos respecto a los controles (114). Por el contrario, otra investigación en pacientes con DAAT en edad pediátrica (MZ; SZ; ZZ) mostró niveles plasmáticos

DISCUSIÓN

significativamente disminuidos de GSH total y un aumento del cociente GSSG/GSH (cambio oxidante) (116). En comparación con estos estudios previos, nuestros resultados -en cuanto a los tioles intracelulares en los neutrófilos de pacientes con DAAT-, muestran que las células procedentes de estos últimos, presentaban niveles elevados de tioles reducidos respecto a controles sanos, en el caso de los niños ($p=0,0142$; Figura 70A), y de los pacientes sin daño pulmonar (aunque las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas) ($p=0,4400$; Figura 73A), en el caso de los adultos bajo condiciones de hipoxia. Las mismas diferencias se observaron cuando se compararon los niveles de la especie GSH en niños asintomáticos ($p=0,0393$; Figura 71A).

En referencia al estudio del cociente entre hipoxia y normoxia, en las muestras en edad pediátrica se encontraron niveles incrementados significativamente de GSH en los pacientes ZZ respecto a los MZ ($p=0,0247$; Figura 71C). De igual forma, se observó un ligero incremento de los tioles reducidos en los grupos de pacientes respecto al grupo control, aunque sin alcanzar en los niños significación estadística ($p=0,3132$; Figura 70C). Estos resultados parecen indicar que la presencia de tioles en neutrófilos de pacientes ZZ se encuentran más influenciados por la hipoxia que los procedentes de los controles. Asimismo, en las muestras de adultos el cociente para los valores de GSH se mostró aumentado significativamente en los pacientes con EPOC no asociada al DAAT, con respecto al resto de los fenotipos ($p=0,0033$; Figura 75C).

DISCUSIÓN

En relación a la expresión génica de las enzimas antioxidantes, en las muestras procedentes de niños, tanto la expresión de la enzima SOD1, como de la SOD2, parecen estar disminuidas, al igual que la GR bajo condiciones de hipoxia.

Uno de los trabajos comentados anteriormente, también ha descrito la actividad de ciertas enzimas antioxidantes en el plasma de los pacientes con DAAT (MZ; SZ; ZZ), en edad pediátrica. En concreto, encontraron niveles significativamente disminuidos de actividad CAT y un aumento de la actividad GPX (116). De igual modo, nuestro estudio en los neutrófilos de pacientes con DAAT, bajo condiciones de hipoxia, mostraron una tendencia al alza de la expresión de la GPX1, a nivel de ARNm. En las muestras procedentes de niños, los neutrófilos ZZ se encontraron ligeramente aumentados respecto a los de los voluntarios sanos ($p=0,4209$; Figura 82A) y, en el caso de los adultos, los neutrófilos ZZ de los pacientes con EPOC estaban significativamente incrementados en comparación con los de los individuos sanos MM ($p=0,0013$) y ZZ sin EPOC ($p=0,0414$; Figura 97A). Respecto a la expresión de la enzima CAT, aunque los resultados globales no fueron tan evidentes, se encontraron niveles disminuidos en los neutrófilos de niños ZZ al incubarlos en condiciones de hipoxia ($p=0,0118$; Figura 81A).

En lo referido al cociente entre hipoxia y normoxia estudiado en los neutrófilos procedentes de niños, se observó una disminución estadísticamente significativa en las enzimas SOD1 ($p=0,0256$; Figura 78C), en el factor de transcripción Nrf2 ($p=0,0366$; Figura 80C) y en GR ($p=0,0182$; Figura 83C) de los neutrófilos ZZ respecto a los neutrófilos

DISCUSIÓN

MM. No obstante, en los adultos no se observaron cambios significativos en las comparaciones entre cociente hipoxia y normoxia.

Al comparar, los niveles medios en hipoxia y normoxia dentro de cada grupo de estudio, los neutrófilos procedentes tanto de niños con DAAT como de voluntarios sanos, incubados bajo condiciones de hipoxia, se apreció un incremento en la expresión de las enzimas antioxidantes estudiadas, SOD2 -que, en el caso del grupo de estudio SZ, resultó ser significativa ($p=0,0238$; Figura 79D) - y GPX1 -que, en el grupo ZZ, resultó ser significativa ($p=0,0117$; Figura 82D)- respecto a los mismos incubados bajo condiciones de normoxia. A su vez, los neutrófilos procedentes de los pacientes adultos con DAAT y de los que sufrían EPOC no asociada al DAAT, incubados en hipoxia, mostraron un ligero incremento en la expresión de las enzimas antioxidantes estudiadas (SOD1, SOD2, CAT, GPX1 y GR), además del gen que codifica el factor de transcripción Nrf2, respecto a los mismos incubados bajo condiciones de normoxia. En el caso de la expresión de las enzimas SOD1 en pacientes MZ ($p=0,0024$; Figura 84D) y ZZ con EPOC ($p=0,0123$; Figura 85D), de GPX1 en pacientes ZZ con EPOC ($p=0,0022$; Figura 97D) y GR en pacientes con EPOC no asociada al DAAT ($p=0,0010$; Figura 100D) estas diferencias entre hipoxia y normoxia fueron estadísticamente significativas.

Estos resultados parecen indicar que la hipoxia podría regular al alza la expresión de ciertas enzimas al alza para tratar de contrarrestar el aumento en las especies reactivas comentado anteriormente.

5.7. Limitaciones y relevancia del estudio

La mayor limitación de este trabajo es el bajo número de pacientes con fenotipo SZ y ZZ, lo que no es sorprendente dada la baja prevalencia de estos fenotipos diagnosticados en la población. En niños, el reducido tamaño muestral de cada uno de los grupos podría suponer un problema para alcanzar conclusiones definitivas extrapolables a la población general; sin embargo, la gran significación encontrada en los análisis comparativos de los diferentes parámetros estudiados indica, que los resultados obtenidos en ellos no variarían de modo significativo tras un aumento en el tamaño muestral de los grupos de estudio mencionados anteriormente.

Por otro lado, el bajo tamaño muestral en el estudio en adultos, así como los factores de confusión comentados anteriormente, supuso un problema para encontrar diferencias que llegaran a alcanzar la significancia estadística. Del mismo modo, aunque dentro de los objetivos trazados se pretendía evaluar el efecto de la terapia de reposición, el escaso número de pacientes ZZ con tratamiento aumentativo no permitió alcanzar conclusiones definitivas.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los neutrófilos procedentes de pacientes pediátricos ZZ asintomáticos, incubados bajo condiciones de hipoxia (1% O₂) y activados con TNF- α y fMLP, presentan una mayor liberación de los gránulos primarios (EN, MPO), secundarios (lactoferrina) y terciarios (MMP-9), producción y liberación de IL-8, una citoquina proinflamatoria, y un incremento en la producción de ROS y RNS (ONOO⁻, H₂O₂ y NO), respecto a los procedentes de controles sanos.
2. La expresión a nivel de ARNm de la enzima CAT se encuentra reducida en los pacientes pediátricos ZZ asintomáticos, lo que explicaría la acumulación de H₂O₂ frente a los controles sanos, dando lugar a un daño oxidativo incrementado en dichas células (MZ, SZ y ZZ).
3. Los neutrófilos procedentes de pacientes pediátricos SZ asintomáticos, bajo condiciones de hipoxia, presentan niveles incrementados de tioles reducidos, incluido el GSH, respecto a los controles sanos.
4. Los neutrófilos procedentes de adultos ZZ con EPOC, incubados en hipoxia y activados, presentan un incremento en la liberación de los gránulos primarios (MPO), de TNF- α y mayor daño oxidativo en las proteínas que los de los controles sanos. Sin embargo, a diferencia de los neutrófilos de los pacientes pediátricos con DAAT asintomáticos, presentan la expresión a nivel de ARNm de GPX1 elevada frente a la de los pacientes ZZ sin EPOC y la de los controles sanos MM, lo que podría considerarse un mecanismo de defensa frente al daño oxidativo.

CONCLUSIONES

En conjunto, estos resultados indican que los neutrófilos ZZ-AAT, asintomáticos o con EPOC, incubados en un ambiente hipóxico, son más agresivos que los de los voluntarios sanos, agravando el daño pulmonar en estos pacientes.

5. La hipoxia induce un fenotipo más agresivo en los neutrófilos de pacientes pediátricos ZZ asintomáticos que la normoxia: produce un incremento en su habilidad para liberar los gránulos primarios (MPO), citoquinas proinflamatorias (IL-8) (también en los pacientes SZ) y producción de H₂O₂. Además, el efecto de la hipoxia sobre los neutrófilos de niños ZZ asintomáticos en la liberación de MPO y MMP-9 es mayor que en los controles MM, como se observa en el incremento del cociente hipoxia/normoxia.
6. Los neutrófilos procedentes de adultos con DAAT incubados bajo hipoxia, muestran la expresión de ciertas enzimas antioxidantes aumentada respecto a los mismos en normoxia, posiblemente para tratar de contrarrestar el aumento en las especies reactivas.
 - Los neutrófilos ZZ con EPOC manifiestan un incremento expresión génica de GPX1
 - Los neutrófilos MZ y ZZ con EPOC muestran mayor expresión génica de SOD1
7. La hipoxia produce mayor efecto en la liberación de AAT en los pacientes con DAAT que en los individuos sanos. Los individuos ZZ, tanto en edad adulta como en edad pediátrica, presentan un cociente hipoxia/normoxia de los niveles de AAT incrementado comparado con el de los controles MM sanos, lo cual sugiere cierta

CONCLUSIONES

adaptación o mecanismo de defensa frente a la enfermedad derivada del DAAT.

La hipoxia induce un fenotipo neutrofílico con mayor capacidad de dañar el tejido pulmonar de los pacientes ZZ-AAT. Asimismo, activa ciertas vías antioxidantes para tratar de frenar el daño provocada por el estrés oxidativo en estos pacientes.

8. Los neutrófilos de pacientes ZZ adultos presentan una viabilidad reducida, bajo condiciones de hipoxia, respecto a los procedentes de voluntarios sanos lo cual podría sugerir un mecanismo de protección.
9. Los resultados acerca de la terapia de reposición parecen indicar un posible reducción de la generación de ROS y RNS. No se encontraron diferencias significativas en la degranulación de los neutrófilos incubados bajo condiciones de hipoxia o normoxia antes y después del tratamiento, que, de producirse, agravaría el daño pulmonar en el paciente. Sin embargo, se requiere ampliar el tamaño muestral para confirmar los hallazgos acerca de la terapia de reposición.

7. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Strnad P, McElvaney NG, Lomas DA. Alpha1-Antitrypsin Deficiency. Longo DL, editor. 2020;382(15):1443–55.
2. Magallón M, Bañuls L, Castillo S, Navarro-García MM, González C, Dasí F. Special Issue: Rare Respiratory Diseases: A Personal and Public Health Issue. *J Clin Med* 2021;10(24):5906.
3. Long GL, Chandra T, Woo SLC, Davie EW, Kurachi K. Complete sequence of the cDNA for human alpha1-antitrypsin and the gene for the S variant. *Biochemistry*. 1984;23(21):4828–37.
4. Hafeez W, Ciliberto G, Perlmutter DH. Constitutive and modulated expression of the human alpha 1 antitrypsin gene. Different transcriptional initiation sites used in three different cell types. *J Clin Invest*. 1992;89(4):1214.
5. Kalsheker NA, Morgan K. Regulation of the α 1-antitrypsin gene and a disease-associated mutation in a related enhancer sequence. *Am J Respir Crit Care Med*.1994;150(6 Pt 2):183-9. Erratum in: *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(3 Pt 1):926.
6. Kalsheker N, Morley S, Morgan K. Gene regulation of the serine proteinase inhibitors α 1-antitrypsin and α 1-antichymotrypsin. *Biochem Soc Trans*. 2002;30(2):93–8.
7. Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet*. 2005;365(9478):2225–36.
8. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of

BIBLIOGRAFÍA

- individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(7):818–900.
9. Lomas DA L, Parfey H. Alpha1-antitrypsin deficiency. 4: *Molecular pathophysiology. Thorax.* 2004;59(6):529–35.
 10. Du Bois RM, Bernaudin JF, Paakko P, Hubbard R, Takahashi H, Ferrans V, et al. Human neutrophils express the alpha 1-antitrypsin gene and produce alpha 1-antitrypsin. *Blood.* 1991;77(12):2724–30.
 11. Venembre P, Boutten A, Seta N, Dehoux MS, Crestani B, Aubier M, et al. Secretion of alpha 1-antitrypsin by alveolar epithelial cells. *FEBS Lett.* 1994;346(2–3):171–4.
 12. Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R, Vogelmeier C, Köhnlein T, Welte T. The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respir Med.* 2011;105(8):1129–39.
 13. de Serres F, Blanco I. Role of alpha-1 antitrypsin in human health and disease. *J Intern Med.* 2014; 276(4):311-35.
 14. Bergin DA, Reeves EP, Meleady P, Henry M, McElvaney OJ, Carroll TP, et al. α -1 Antitrypsin regulates human neutrophil chemotaxis induced by soluble immune complexes and IL-8. *J Clin Invest.* 2010;120(12):4236–50.
 15. Janciauskiene S, Nita I, Subramaniam D, Li Q, Lancaster JR, Matalon S. Alpha1-antitrypsin inhibits the activity of the matriptase catalytic domain in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.*

BIBLIOGRAFÍA

- 2008;39(6):631–7.
16. Lazrak A, Nita I, Subramaniam D, Wei S, Song W, Ji HL, et al. Alpha(1)-antitrypsin inhibits epithelial Na⁺ transport in vitro and in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;41(3):261–70.
 17. Pott GB, Chan ED, Dinarello CA, Shapiro L. α -1-Antitrypsin is an endogenous inhibitor of proinflammatory cytokine production in whole blood. *J Leukoc Biol*. 2009;85(5):886–95.
 18. Chan ED, Pott GB, Silkoff PE, Ralston AH, Bryan CL, Shapiro L. Alpha-1-antitrypsin inhibits nitric oxide production. *J Leukoc Biol*. 2012;92(6):1251–60.
 19. Levine RL, Berlett BS, Moskovitz J, Mosoni L, Stadtman ER. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev*. 1999;107(3):323–32.
 20. Bucurenci N, Blake DR, Chidwick K, Winyard PG. Inhibition of neutrophil superoxide production by human plasma α 1-antitrypsin. *FEBS Lett*. 1992;300(1):21–4.
 21. Miyamoto Y, Akaike T, Alam MS, Inoue K, Hamamoto T, Ikebe N, et al. Novel Functions of Human α 1-Protease Inhibitor after S-Nitrosylation: Inhibition of Cysteine Protease and Antibacterial Activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;267(3):918–23.
 22. Taggart C, Cervantes-Laurean D, Kim G, McElvaney NG, Wehr N, Moss J, et al. Oxidation of either methionine 351 or

BIBLIOGRAFÍA

- methionine 358 in α 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *J Biol Chem.* 2000;275(35):27258–65.
23. Liu Z, Zhou X, Shapiro SD, Shipley JM, Twining SS, Diaz LA, et al. The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. *Cell.* 2000;102(5):647–55.
 24. Cantin AM, Woods DE. Aerosolized prolastin suppresses bacterial proliferation in a model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(4):1130–5.
 25. Knappstein S, Ide T, Schmidt MA, Heusipp G. Alpha 1-antitrypsin binds to and interferes with functionality of EspB from atypical and typical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun.* 2004;72(8):4344–50.
 26. Chan ED, Kaminska AM, Gill W, Chmura K, Feldman NE, Bai X, et al. Alpha-1-antitrypsin (AAT) anomalies are associated with lung disease due to rapidly growing mycobacteria and AAT inhibits *Mycobacterium abscessus* infection of macrophages. *Scand J Infect Dis.* 2007;39(8):690–6.
 27. Lushbaugh WB, Kairalla AB, Hofbauer AF, Arnaud P, Cantey JR, Pittman FE. Inhibition of *Entamoeba histolytica* cytotoxin by alpha 1 antiprotease and alpha 2 macroglobulin. *Am J Trop Med Hyg.* 1981;30(3):575–85.
 28. Forney JR, Yang S, Healey MC. Antagonistic effect of human alpha-1-antitrypsin on excystation of *Cryptosporidium parvum*

BIBLIOGRAFÍA

- oocysts. *J Parasitol.* 1997;83(4):771–4.
29. Forney JR, Yang S, Healey MC. Synergistic anticryptosporidial potential of the combination alpha-1-antitrypsin and paromomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(9):2006–8.
 30. Petrache I, Fijalkowska I, Medler TR, Skirball J, Cruz P, Zhen L, et al. alpha-1 antitrypsin inhibits caspase-3 activity, preventing lung endothelial cell apoptosis. *Am J Pathol.* 2006;169(4):1155–66.
 31. Lewis EC, Shapiro L, Bowers OJ, Dinarello CA. Alpha1-antitrypsin monotherapy prolongs islet allograft survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(34):12153–8.
 32. Vidal R, Blanco I, Casas F, Jardí R, Miratvilles M, Barros-Tizón JC, et al. Diagnóstico y tratamiento del déficit de alfa-1-antitripsina. *Arch Bronconeumol.* 2006;42(12):645–59.
 33. Gallego BL. Registro Español de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina: evaluación de la base de datos y estudio de la población de pacientes incluida [tesis doctoral]. España: Universitat de Lleida; 2014.
 34. Engh R, Löbermann H, Schneider M, Wiegand G, Huber R, Laurell CB. The S variant of human alpha 1-antitrypsin, structure and implications for function and metabolism. *Protein Eng.* 1989;2(6):407–15.

BIBLIOGRAFÍA

35. Lomas DA, Evans DL, Finch JT, Carrell RW. The mechanism of Z α 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature*. 1992;357(6379):605–7.
36. Lomas DA, Mahadeva R. Alpha1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy. *J Clin Invest*. 2002;110(11):1585–90.
37. Mahadeva R, Atkinson C, Li Z, Stewart S, Janciauskiene S, Kelley DG, et al. Polymers of Z alpha1-antitrypsin co-localize with neutrophils in emphysematous alveoli and are chemotactic in vivo. *Am J Pathol*. 2005;166(2):377–86.
38. Ogushi F, Fells GA, Hubbard RC, Straus SD, Crystal RG. Z-type alpha 1-antitrypsin is less competent than M1-type alpha 1-antitrypsin as an inhibitor of neutrophil elastase. *J Clin Invest*. 1987;80(5):1366–74.
39. Teckman JH, Mangalat N. Alpha-1 antitrypsin and liver disease: mechanisms of injury and novel interventions. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;9(2):261–8.
40. Silverman EK. Exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease: do they contribute to disease progression?. *Proc Am Thorac Soc*. 2007;4(8):586–90.
41. Patel D, Teckman JH. Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Liver Disease. *Clin Liver Dis*. 2018;22(4):643-655.
42. Rudnick DA, Shikapwashya O, Blomenkamp K, Teckman JH.

BIBLIOGRAFÍA

- Indomethacin increases liver damage in a murine model of liver injury from alpha-1-antitrypsin deficiency. *Hepatology*. 2006;44(4):976–82.
43. Blanco I, Lara B. Déficit de alfa-1 antitripsina: fisiopatología, enfermedades relacionadas, diagnóstico y tratamiento. 2nd. ed. Editorial Respira-SEPAR; 2016.
 44. Tonelli AR, Brantly ML. Augmentation therapy in alpha-1 antitrypsin deficiency: Advances and controversies. *Ther Adv Respir Dis*. 2010;4(5):289–312.
 45. Chapman KR, Burdon JGW, Piitulainen E, Sandhaus RA, Seersholm N, Stocks JM, et al. Intravenous augmentation treatment and lung density in severe α 1 antitrypsin deficiency (RAPID): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2015;386(9991):360–8.
 46. Torres-Durán M, Lopez-Campos JL, Barrecheguren M, Miravittles M, Martinez-Delgado B, Castillo S, et al. Alpha-1 antitrypsin deficiency: outstanding questions and future directions. *Orphanet J Rare Dis*. 2018;13(1):114.
 47. Parham P. *The immune system*. 5th. ed. W. W. Norton & company;2021.
 48. Alam R. A brief review of the immune system. *Prim Care*. 1998;25(4):727–38.
 49. Forehand JR, Pabst MJ, Phillips WA, Johnston RB.

BIBLIOGRAFÍA

- Lipopolysaccharide priming of human neutrophils for an enhanced respiratory burst. Role of intracellular free calcium. *J Clin Invest.* 1989;83(1):74–83.
50. Berkow RL, Wang D, Larrick JW, Dodson RW, Howard TH. Enhancement of neutrophil superoxide production by preincubation with recombinant human tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1987;139(11):3783-91.
51. Fleischmann J, Golde DW, Weisbart RH, Gasson JC. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Enhances Phagocytosis of Bacteria by Human Neutrophils. *Blood.* 1986;68(3):708–11.
52. Vercellotti G, Yin H, Gustafson K, Nelson R, Jacob H. Platelet-Activating Factor Primes Neutrophil Responses to Agonists: Role in Promoting Neutrophil-Mediated Endothelial Damage. *Blood.* 1988;71(4):1100–7.
53. Guthrie LA, McPhail LC, Henson PM, Johnston RB. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J Exp Med.* 1984;160(6):1656–71.
54. Condliffe AM, Chilvers ER, Haslett C, Dransfield I. Priming differentially regulates neutrophil adhesion molecule expression/function. *Immunology.* 1996;89(1):105–11.
55. Fittschen C, Sandhaus RA, Worthen GS, Henson PM. Bacterial

BIBLIOGRAFÍA

- lipopolysaccharide enhances chemoattractant-induced elastase secretion by human neutrophils. *J Leukoc Biol.* 1988;43(6):547–56.
56. Koenderman L, Kanters D, Maesen B, Raaijmakers J, Lammers J-WJ, Kruif J de, et al. Monitoring of neutrophil priming in whole blood by antibodies isolated from a synthetic phage antibody library. *J Leukoc Biol.* 2000;68(1):58–64.
57. Hoenderdos K, Lodge KM, Hirst RA, Chen C, Palazzo SG, Emerenciana A, et al. Hypoxia upregulates neutrophil degranulation and potential for tissue injury. *Thorax.* 2016;71(11):1030–8.
58. Murphy MP, McEnery T, McQuillan K, McElvaney OF, McElvaney OJ, Landers S, et al. α 1 Antitrypsin therapy modulates the neutrophil membrane proteome and secretome. *Eur Respir J.* 2020;55(4):1901678.
59. Bergin DA, Reeves EP, Hurley K, Wolfe R, Jameel R, Fitzgerald S, et al. The Circulating Proteinase Inhibitor α -1 Antitrypsin Regulates Neutrophil Degranulation and Autoimmunity. *Sci Transl Med.* 2014;6(217):217ra1.
60. Potera RM, Jensen MJ, Hilkin BM, South GK, Hook JS, Gross EA, et al. Neutrophil azurophilic granule exocytosis is primed by TNF- α and partially regulated by NADPH oxidase. *Innate Immun.* 2016;22(8):635–46.
61. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.*

BIBLIOGRAFÍA

- 2005;23:197–223.
62. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood*. 1998;92(9):3007–17.
 63. Winterbourn CC, Hampton MB, Livesey JH, Kettle AJ. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *J Biol Chem*. 2006;281(52):39860–9.
 64. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(3):173–82.
 65. El-Benna J, Dang PM-C, Gougerot-Pocidallo M-A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol*. 2008;30(3):279–89.
 66. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;176(2):231–41.
 67. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*. 2009;16(11):1438–44.
 68. Cassatella MA, Östberg NK, Tamassia N, Soehnlein O. Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines. *Trends Immunol*. 2019;40(7):648–64.

BIBLIOGRAFÍA

69. Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, Sengeløv H, Bastholm L, Nielsen MH, et al. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol.* 1993;51(4):187–98.
70. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood.* 1997;89(10):3503–21.
71. Bakowski B, Tschesche H. Migration of polymorphonuclear leukocytes through human amnion membrane--a scanning electron microscopic study. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1992;373(7):529–46.
72. Owen CA, Campbell EJ. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol.* 1999;65(2):137–50.
73. Oram JD, Reiter B. Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents. *Biochim Biophys Acta.* 1968;170(2):351–65.
74. Chapple DS, Joannou CL, Mason DJ, Shergill JK, Odell EW, Gant V, et al. A helical region on human lactoferrin. Its role in antibacterial pathogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 1998;443:215–20.
75. Hao L, Shan Q, Wei J, Ma F, Sun P. Lactoferrin: Major Physiological Functions and Applications. *Curr Protein Pept Sci.* 2018;20(2):139–44.
76. Sengeløv H, Kjeldsen L, Borregaard N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol.* 1993;150(4) :1535-43.

BIBLIOGRAFÍA

77. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians*. 1999;111(5):383–9.
78. El Kebir D, József L, Pan W, Filep JG. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. *Circ Res*. 2008;103(4):352–9.
79. Benabid R, Wartelle J, Malleret L, Guyot N, Gangloff S, Lebargy F, et al. Neutrophil Elastase Modulates Cytokine Expression: contribution to host defense against *pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia. *J Biol Chem*. 2012;287(42):34883-34894.
80. Mihara K, Ramachandran R, Renaux B, Saifeddine M, Hollenberg MD. Neutrophil Elastase and Proteinase-3 Trigger G Protein-biased Signaling through Proteinase-activated Receptor-1 (PAR1). *J Biol Chem*. 2013;288(46):32979–90.
81. Clemmensen SN, Jacobsen LC, Rørvig S, Askaa B, Christenson K, Iversen M, et al. Alpha-1-antitrypsin is produced by human neutrophil granulocytes and their precursors and liberated during granule exocytosis. *Eur J Haematol*. 2011;86(6):517–30.
82. Tonks NK. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell*. 2005;121(5):667–70.
83. Aneta M-H, Demkow U. Neutrophils: The Role of Oxidative and Nitrosative Stress in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol Respir*. 2015;857(12):51–60.
84. Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, McEver RP, McIntyre

BIBLIOGRAFÍA

- TM. Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *J Cell Biol.* 1991;112(4):749–59.
85. Celec P. Nuclear factor kappa B--molecular biomedicine: the next generation. *Biomed Pharmacother.* 2004;58(6–7):365–71.
86. Matthews JR, Kaszubska W, Turcatti G, Wells TN, Hay RT. Role of cysteine62 in DNA recognition by the P50 subunit of NF-kappa B. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(8):1727–34.
87. Knaus UG, Heyworth PG, Evans T, Curnutte JT, Bokoch GM. Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science.* 1991;254(5037):1512–5.
88. Britigan BE, Coffman TJ, Buettner GR. Spin trapping evidence for the lack of significant hydroxyl radical production during the respiration burst of human phagocytes using a spin adduct resistant to superoxide-mediated destruction. *J Biol Chem.* 1990;265(5):2650–6.
89. Ramos CL, Pou S, Britigan BE, Cohen MS, Rosen GM. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. *J Biol Chem.* 1992;267(12):8307–12.
90. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Caputi AP, Aston K, Riley DP, et al. Protective effects of a new stable, highly active SOD mimetic, M40401 in splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Br J Pharmacol.* 2001;132(1):19.

BIBLIOGRAFÍA

91. Magallón M, Carrión AE, Bañuls L, Pellicer D, Castillo S, Bondía S, et al. Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress in Rare Respiratory Diseases. *J Clin Med*. 2021;10(6):1–27.
92. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(9–10):1865–79.
93. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(9):689–709.
94. Schmidt HHHW, Stocker R, Vollbracht C, Paulsen G, Riley D, Daiber A, et al. Antioxidants in Translational Medicine. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(14):1130–43.
95. Ballmann C, McGinnis G, Peters B, Slivka D, Cuddy J, Hailes W, et al. Exercise-induced oxidative stress and hypoxic exercise recovery. *Eur J Appl Physiol*. 2014;114(4):725–33.
96. Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys acta Mol cell Res*. 2018;1865(5):721–33.
97. McCarthy C, Reeves EP, McElvaney NG. The Role of Neutrophils in Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13 Suppl 4:S297–304.
98. Hubbard RC, Fells G, Gadek J, Pacholok S, Humes J, Crystal RG. Neutrophil accumulation in the lung in alpha 1-antitrypsin deficiency. Spontaneous release of leukotriene B4 by alveolar

BIBLIOGRAFÍA

- macrophages. *J Clin Invest.* 1991;88(3):891–7.
99. Malerba M, Ricciardolo F, Radaeli A, Torregiani C, Ceriani L, Mori E, et al. Neutrophilic inflammation and IL-8 levels in induced sputum of alpha-1-antitrypsin PiMZ subjects. *Thorax.* 2006;61(2):129–33.
100. Mulgrew AT, Taggart CC, Lawless MW, Greene CM, Brantly ML, O'Neil SJ, et al. Z alpha1-antitrypsin polymerizes in the lung and acts as a neutrophil chemoattractant. *Chest.* 2004;125(5):1952–7.
101. Nakamura H, Yoshimura K, McElvaney NG, Crystal RG. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J Clin Invest.* 1992;89(5):1478–84.
102. O'Dwyer CA, O'Brien ME, Wormald MR, White MM, Banville N, Hurley K, et al. The BLT1 Inhibitory Function of α -1 Antitrypsin Augmentation Therapy Disrupts Leukotriene B₄ Neutrophil Signaling. *J Immunol.* 2015;195(8):3628–41. A
103. Rouhani F, Paone G, Smith NK, Krein P, Barnes P, Brantly ML. Lung Neutrophil Burden Correlates With Increased Pro-Inflammatory Cytokines and Decreased Lung Function in Individuals With α 1-Antitrypsin Deficiency. *Chest.* 2000;117(5):250S-251S.
104. Gadek JE, Fells GA, Crystal RG. Cigarette smoking induces

BIBLIOGRAFÍA

- functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans. *Science*. 1979;206(4424):1315–6.
105. Carp H, Miller F, Hoidal JR, Janoff A. Potential mechanism of emphysema: alpha 1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(6):2041–5.
 106. Taggart C, Cervantes-Laurean D, Kim G, McElvaney NG, Wehr N, Moss J, et al. Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *J Biol Chem*. 2000;275(35):27258–65.
 107. Devaney JM, Greene CM, Taggart CC, Carroll TP, O'Neill SJ, McElvaney NG. Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. *FEBS Lett*. 2003;544(1–3):129–32.
 108. Carroll TP, Greene CM, Taggart CC, Bowie AG, O'Neill SJ, McElvaney NG. Viral inhibition of IL-1- and neutrophil elastase-induced inflammatory responses in bronchial epithelial cells. *J Immunol*. 2005;175(11):7594–601.
 109. Hurley K, Lacey N, O'Dwyer CA, Bergin DA, McElvaney OJ, O'Brien ME, et al. Alpha-1 antitrypsin augmentation therapy corrects accelerated neutrophil apoptosis in deficient individuals. *J Immunol*. 2014;193(8):3978–91.
 110. Petrache I, Fijalkowska I, Zhen L, Medler TR, Brown E, Cruz P, et

BIBLIOGRAFÍA

- al. A novel antiapoptotic role for alpha1-antitrypsin in the prevention of pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(11):1222–8.
111. Zhang B, Lu Y, Campbell-Thompson M, Spencer T, Wasserfall C, Atkinson M, et al. Alpha1-antitrypsin protects beta-cells from apoptosis. *Diabetes*. 2007;56(5):1316–23.
112. Spriggs DR, Sherman ML, Imamura K, Mohri M, Rodriguez C, Robbins G, et al. Phospholipase A2 Activation and Autoinduction of Tumor Necrosis Factor Gene Expression by Tumor Necrosis Factor. *Cancer Res*. 1990;50(22):7101-7.
113. Fiedler MA, Wernke-Dollries K, Stark JM. Inhibition of TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and IL-8 release in A549 cells with the proteasome inhibitor MG-132. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;19(2):259–68.
114. Papp E, Száiráz P, Korcsmáiros T, Csermely P, Papp E, Száiráz P, et al. Changes of endoplasmic reticulum chaperone complexes, redox state, and impaired protein disulfide reductase activity in misfolding α 1-antitrypsin transgenic mice. *FASEB J*. 2006;20(7):1018–20.
115. Marcus NY, Blomenkamp K, Ahmad M, Teckman JH. Oxidative stress contributes to liver damage in a murine model of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Exp Biol Med*. 2012;237(10):1163–72.
116. Escribano A, Amor M, Pastor S, Castillo S, Sanz F, Codoñer-Franch P, et al. Decreased glutathione and low catalase activity

BIBLIOGRAFÍA

- contribute to oxidative stress in children with α -1 antitrypsin deficiency. *Thorax*. 2015;70(1):82–3.
117. Topic A, Nagorni-Obradovic L, Francuski D, Lujic M, Malic Z, Radojkovic D. Oxidative Stress and Polymorphism of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Two Patients with Severe Alpha-1-Antitrypsin Deficiency. *Biochem Genet*. 2016;54(5):746–52.
 118. Escribano A, Pastor S, Reula A, Castillo S, Vicente S, Sanz F, et al. Accelerated telomere attrition in children and teenagers with α 1-antitrypsin deficiency. *Eur Respir J*. 2016;48(2):350–8.
 119. Caldwell CC, Kojima H, Lukashev D, Armstrong J, Farber M, Apasov SG, et al. Differential Effects of Physiologically Relevant Hypoxic Conditions on T Lymphocyte Development and Effector Functions. *J Immunol*. 2001;167(11):6140–9.
 120. de Groot H, Noll T, Sies H. Oxygen dependence and subcellular partitioning of hepatic menadione-mediated oxygen uptake: Studies with isolated hepatocytes, mitochondria, and microsomes from rat liver in an oxystat system. *Arch Biochem Biophys*. 1985;243(2):556–62.
 121. Sies H. Oxygen Gradients During Hypoxic Steady States in Liver. Urate Oxidase and Cytochrome Oxidase as Intracellular O₂ Indicators. 1977;358(2):1021–32.
 122. Gale DP, Maxwell PH. The role of HIF in immunity. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(4):486–94.

BIBLIOGRAFÍA

123. Montgomery ST, Mall MA, Kicic A, Stick SM. Hypoxia and sterile inflammation in cystic fibrosis airways: mechanisms and potential therapies. *Eur Respir J.* 2017;49(1):1600903.
124. McGovern NN, Cowburn AS, Porter L, Walmsley SR, Summers C, Thompson AAR, et al. Hypoxia Selectively Inhibits Respiratory Burst Activity and Killing of *Staphylococcus aureus* in Human Neutrophils. *J Immunol.* 2011;186(1):453.
125. Vince RV, Christmas B, Midgley AW, McNaughton LR, Madden LA. Hypoxia mediated release of endothelial microparticles and increased association of S100A12 with circulating neutrophils. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2(1):2–6.
126. Lahiri S, Roy A, Baby SM, Hoshi T, Semenza GL, Prabhakar NR. Oxygen sensing in the body. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006 ;91(3):249–86.
127. Harris AJ, Thompson AR, Whyte MK, Walmsley SR. HIF-mediated innate immune responses: cell signaling and therapeutic implications. *Hypoxia (Auckl).* 2014;2:47-58.
128. McGettrick AF, O'Neill LAJ. The Role of HIF in Immunity and Inflammation. *Cell Metab.* 2020;32(4):524–36.
129. Walmsley SR, Print C, Farahi N, Peyssonnaud C, Johnson RS, Cramer T, et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity. *J Exp Med.* 2005;201(1):105.

BIBLIOGRAFÍA

130. Mecklenburgh K, Blood SW-, Journal T, 2002 undefined. Involvement of a ferroprotein sensor in hypoxia-mediated inhibition of neutrophil apoptosis. *Blood*. 2002;100(8):3008-16.
131. Ertel W, Morrison MH, Ayala A, Chaudry IH. Hypoxemia in the absence of blood loss or significant hypotension causes inflammatory cytokine release. *Am J Physiol*. 1995;269(1 Pt 2):R160-6.
132. Hartmann G, Tschöp M, Fischer R, Bidlingmaier C, Riepl R, Tschöp K, et al. High altitude increases circulating interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and c-reactive protein. *Cytokine*. 2000;12(3):246–52.
133. Hoenderdos K, Condliffe A. The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;48(5):531–9.
134. Iannitti RG, Casagrande A, De Luca A, Cunha C, Sorci G, Riuzzi F, et al. Hypoxia promotes danger-mediated inflammation via receptor for advanced glycation end products in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(11):1338–50.
135. Thompson AAR, Binham J, Plant T, Whyte MKB, Walmsley SR. Hypoxia, the HIF pathway and neutrophilic inflammatory responses. *Biol Chem*. 2013;394(4):471–7.
136. Tamura DY, Moore EE, Partrick DA, Johnson JL, Offner PJ, Silliman CC. Acute hypoxemia in humans enhances the neutrophil inflammatory response. *Shock*. 2002;17(4):269–73.

BIBLIOGRAFÍA

137. Haas F, Bergofsky EH. Role of the mast cell in the pulmonary pressor response to hypoxia. *J Clin Invest.* 1972;51(12):3154–62.
138. Pinsky DJ, Naka Y, Liao H, Oz MC, Wagner DD, Mayadas TN, et al. Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *J Clin Invest.* 1996;97(2):493–500.
139. Chao J, Wood JG, Gonzalez NC. Alveolar macrophages initiate the systemic microvascular inflammatory response to alveolar hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011;178(3):439–48.
140. Ong CWM, Fox K, Ettorre A, Elkington PT, Friedland JS. Hypoxia increases neutrophil-driven matrix destruction after exposure to *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep.* 2018;8(1):11475.
141. Peyssonnaud C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, et al. HIF-1 α expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest.* 2005;115(7):1806–15.
142. Fouret P, Du Bois RM, Bernaudin JF, Takahashi H, Ferrans VJ, Crystal RG. Expression of the neutrophil elastase gene during human bone marrow cell differentiation. *J Exp Med.* 1989;169(3):833–45.
143. Shrestha B, Dunn L. The Declaration of Helsinki on Medical Research involving Human Subjects: A Review of Seventh Revision. *J Nepal Health Res Counc.* 2020;17(4):548–52.

BIBLIOGRAFÍA

144. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-54.
145. Crow JP. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide.* 1997;1(2):145-57.
146. Kalyanaraman B, Hardy M, Podsiadly R, Cheng G, Zielonka J. Recent developments in detection of superoxide radical anion and hydrogen peroxide: Opportunities, challenges, and implications in redox signaling. *Arch Biochem Biophys.* 2017;617:38-47.
147. Namin SM, Nofallah S, Joshi MS, Kavallieratos K, Tsoukias NM. Kinetic analysis of DAF-FM activation by NO: toward calibration of a NO-sensitive fluorescent dye. *Nitric Oxide.* 2013;28:39-46.
148. Hedley DW, Chow S. Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry. *Cytometry.* 1994;15(4):349-58.
149. Webb C, Bedwell C, Guth A, Avery P, Dow S. Use of flow cytometry and monochlorobimane to quantitate intracellular glutathione concentrations in feline leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;112(3-4):129-40.
150. Petrat F, Pindiur S, Kirsch M, de Groot H. "Mitochondrial"

BIBLIOGRAFÍA

- photochemical drugs do not release toxic amounts of $10(2)$ within the mitochondrial matrix space. *Arch Biochem Biophys*. 2003;412(2):207–15.
151. Dikalov I, Harrison DG. Methods for Detection of Mitochondrial and Cellular Reactive Oxygen Species. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(2):372–82.
152. Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca^{2+} -indicator dyes. *Cell Calcium*. 2000;27(2):97–106.
153. Raudsepp P, Brüggemann DA, Andersen ML. Detection of radicals in single droplets of oil-in-water emulsions with the lipophilic fluorescent probe BODIPY(665/676) and confocal laser scanning microscopy. *Free Radic Biol Med*. 2014;70:233–40.
154. Chaudhuri AR, de Waal EM, Pierce A, Van Remmen H, Ward WF, Richardson A. Detection of protein carbonyls in aging liver tissue: A fluorescence-based proteomic approach. *Mech Ageing Dev*. 2006;127(11):849–61.
155. Reula A, Pellicer D, Castillo S, Magallón M, Armengot M, Herrera G, et al. New Laboratory Protocol to Determine the Oxidative Stress Profile of Human Nasal Epithelial Cells Using Flow Cytometry. *J Clin Med*. 2021;10(6):1172.
156. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$

BIBLIOGRAFÍA

- Method. Methods. 2001;25(4):402–8.
157. Janciauskiene S, DeLuca DS, Barrecheguren M, Welte T, Miravittles M, Ancochea J, et al. Serum Levels of Alpha1-antitrypsin and Their Relationship With COPD in the General Spanish Population. Arch Bronconeumol. 2020;56(2):76-83.

8. TRABAJOS DERIVADOS

8.1. Trabajos publicados

1. **Título:** Alpha-1 antitrypsin deficiency: outstanding questions and future directions.

Autores: Torres-Durán M, Lopez-Campos JL, Barrecheguren M, Miravittles M, Martinez-Delgado B, Castillo S, Escribano A, Baloira A, Navarro-Garcia MM, Pellicer D, Bañuls L, **Magallón M**, Casas F, Dasí F

Revista: Orphanet Journal of Rare Diseases

Año de publicación: 2018

Identificador PMID: 29996870

2. **Título:** Oxidative Stress in COPD.

Autores: **Magallón M**; Navarro-García MM; Dasí F

Revista: Journal of Clinical Medicine

Año de publicación: 2019

Identificador PMID: 31766150

3. **Título:** Gene Therapy in Rare Respiratory Diseases: What Have We Learned So Far?

Autores: Bañuls L, Pellicer D, Castillo S, Navarro-García MM, **Magallón M**, González C, Dasí F

Revista: Journal of Clinical Medicine

Año de publicación: 2020

Identificador PMID: 32784514

TRABAJOS DERIVADOS

- 4. Título:** Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress in Rare Respiratory Diseases.

Autores: Magallón M, Pastor S, Carrión AE, Bañuls L, Pellicer D, Castillo S, Bondía S, Navarro-García MM, González C, Dasí F

Revista: Journal of Clinical Medicine

Año de publicación: 2021

Identificador PMID: 33803835

- 5. Título:** New Laboratory Protocol to Determine the Oxidative Stress Profile of Human Nasal Epithelial Cells Using Flow Cytometry

Autores: Reula A, Pellicer D, Castillo S, Magallón M, Armengot M, Herrera G, O'Connor JE, Bañuls L, Navarro-García MM, Escribano A, Dasí F

Revista: Journal of Clinical Medicine

Año de publicación: 2021

Identificador PMID: 33799667

- 6. Título:** Special Issue: Rare Respiratory Diseases: A Personal and Public Health Issue.

Autores: Magallón M; Bañuls L; Castillo S; Navarro-García MM; Gonzalez C; Dasí F

Revista: Journal of Clinical Medicine

Año de publicación: 2021

Identificador PMID: 34945201

- 7. Título:** Capítulo 6: Determinación del perfil de citoquinas y del perfil oxidativo en polimorfonucleares neutrófilos en el déficit de alfa-1

TRABAJOS DERIVADOS

antitripsina, del manual SEPAR de procedimientos: “Procedimientos técnicos de laboratorio para el diagnóstico del déficit de alfa-1 antitripsina”. (Editorial Respira)

Autores: Dasí F, Magallón M

Editorial: Editorial Respira-Fundación española del pulmón-SEPAR

Año de publicación: 2022

Identificador ISBN: 978-84-124841-2-0

8.2. Posters presentados en congresos

- 1. Título:** *Effect of hypoxia on degranulation and oxidative profile of neutrophils in patients with alpha-1 antitrypsin deficiency.*

Autores: Magallón M, Pellicer D, Castillo S, Bañuls L, Navarro-García MM, Escribano A, Dasí F

Congreso: II International Meeting on Rare Respiratory Diseases

Lugar y año: Valencia, 2018
- 2. Título:** Papel de la hipoxia en la activación de neutrófilos y perfil oxidativo en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina.

Autores: Magallón M, Pellicer D, Castillo S, Bañuls L, Navarro-García MM, Escribano A, Dasí F

Congreso: XXVI Congreso 2019 de la Sociedad Valenciana De Neumología

Lugar y año: Peñíscola, 2019

TRABAJOS DERIVADOS

- 3. Título:** Efecto de la hipoxia en la degranulación y perfil oxidativo de neutrófilos en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina.

Autores: Magallón M, Pellicer D, Castillo S, Bañuls L, Navarro-García MM, Escribano A, Dasí F

Congreso: 52º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR)

Lugar y año: Santiago de Compostela, 2019

- 4. Título:** *Neutrophil degranulation and oxidative profile in patients with alpha-1 antitrypsin deficiency under hypoxic conditions.*

Autores: Magallón M, Pellicer D, Castillo S, Bañuls L, Navarro-García MM, Escribano A, Dasí F

Congreso: *European Respiratory Society (ERS) International Congress 2019*

Lugar y año: Madrid, 2019

- 5. Título:** *Hypoxia induces proinflammatory cytokines production in alpha-1 antitrypsin deficiency patients.*

Autores: Magallón M, Castillo S, Pellicer D, Bañuls L, Bondia S, Navarro-García MM, González C, Dasí F

Congreso: *European Respiratory Society (ERS) International Congress 2021*

Lugar y año: Virtual, 2021

- 6. Título:** La hipoxia produce un fenotipo neutrofílico más agresivo en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina.

TRABAJOS DERIVADOS

Autores: Magallón M, Bañuls L, Navarro-García MM, Herrejón A, González C, Castillo S, Dasí F

Congreso: XXIX Congreso Anual de la Sociedad Valenciana De Neumología

Lugar y año: Valencia, 2022

9. ANEXOS

Anexo 1

COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN DE HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA



Hospital Clínic Universitari



DEPARTAMENT CLÍNIC MALVA-ROSA

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

Don Diego V. Cano Blanquer, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic Universitari de Valencia

CERTIFICA

Que en este Comité, en su reunión de fecha 30 de noviembre de 2017, 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:

Estudio del efecto de la hipoxia en la degranulación, producción de citoquinas y perfil oxidativo de neutrófilos de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina.

Mismo que será llevado a cabo en los Laboratorios del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA en colaboración con el Servicio de Pediatría y cuyo investigador principal es el Dr. Francisco Dasí Fernández, 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*** (París 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Lo que certifico a efectos oportunos de la convocatoria de ayudas a Proyectos de Investigación en Salud del Instituto Salud Carlos III.

Valencia, 30 de noviembre de 2017.

Fdo. : Don Diego V. Cano Blanquer
Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica

COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL DE MANISES

LaFe
 Departament
 de Salut

FPNT-CEIB-04 (B)

**DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON
 MEDICAMENTOS**

Dña. María Tordera Baviera, titular de la Secretaría Técnica del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha 27 de junio de 2018, el Proyecto de Investigación:

Título: "ESTUDIO DEL EFECTO DE LA HIPOXIA EN LA DEGRANULACIÓN, PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS Y PERFIL OXIDATIVO DE NEUTRÓFILOS DE PACIENTES CON DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA."

Nº de registro: HIPOXIA-DAAT

Promotor: DR. FRANCISCO JOSÉ DASÍ. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA INCLIVA.

Versión/fecha de la memoria del proyecto: FIS-2017 (incluyendo las aclaraciones solicitadas por el CEIm)

Versión/fecha de la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado:

- HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE PEDIÁTRICO (Entre 12-17 años), versión 1.1, Manises, 01/06/2018.
- HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE PEDIÁTRICO (PADRES Y TUTORES DE MENORES DE 12 AÑOS), versión 1.1, Manises, 01/06/2018.
- HOJA DE INFORMACIÓN AL VOLUNTARIO SANO PEDIÁTRICO (12-17 años), versión 1.1, Manises, 01/06/2018.
- HOJA DE INFORMACIÓN AL VOLUNTARIO SANO PEDIÁTRICO (Menores de 12 años), versión 1.1, Manises, 01/06/2018.

Que dicho proyecto se ajusta a las normativas éticas sobre Investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, así como la Hoja de Información al Paciente y el Consentimiento Informado.

En consecuencia, este Comité acuerda emitir **INFORME FAVORABLE** de dicho Proyecto de Investigación, que será realizado en el HOSPITAL DE MANISES, por el/la Dr. / Dra. M^a TERESA ROMERO RUBIO del servicio/unidad/grupo de investigación de PEDIATRÍA como Investigador Principal.

Que el CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que, en el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés, no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del estudio clínico.

Lo que firmo en Valencia, a 27 de junio de 2018

Fdo.: Dra. María Tordera Baviera
 Secretaria Técnica del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos



ANEXOS

COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN HOSPITAL DR. PESET DE
VALENCIA



**A/A.: Dr. Alberto Herrejón
Servicio de Neumología**

Dña. Pilar Codoñer Franch, Presidenta del Comité Ético de Investigación
Clínica del Hospital Universitario Dr. Peset.

CERTIFICA:

Que este comité en su reunión celebrada el día 28 de febrero de 2018 ha
evaluado y ha aprobado el estudio titulado: .- Estudio del efecto de la
hipoxia en la degranulación, producción de citoquinas y perfil oxidativo de
neutrófilos de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina

Proyecto de investigación. FIS

Código Ceic: 1/18

Valencia 8 de marzo de 2018



Fdo.: Dra. Pilar Codoñer Franch

Anexo 2

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE PEDIÁTRICO (Menores de 12 años)

Se te ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado **“Estudio del efecto de la hipoxia en la degranulación, en la producción de citoquinas y en el perfil oxidativo de los neutrófilos de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina”** que está siendo realizado por los **Drs. Amparo Escribano Montaner y Francisco Dasí Fernández** del Servicio de **Pediatría** y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Antecedentes: El déficit de alfa-1-antitripsina (DAAT) es un trastorno metabólico de carácter hereditario (que se transmite de padres a hijos) que está causado por cambios en una proteína que se llama alfa-1 antitripsina (AAT), la cual se produce principalmente en el hígado. La principal función de la AAT es proteger al tejido pulmonar del daño causado por una proteína llamada elastasa. A causa de esto, los pacientes pueden llegar a desarrollar problemas pulmonares y en el hígado que en algunos casos pueden ser graves. No obstante, debido entre otras causas al bajo número de pacientes afectados, no se dispone de tratamientos eficientes y definitivos que consigan mejorar la calidad de vida de los pacientes que la padecen. Investigaciones recientes han descubierto que los neutrófilos (un tipo de célula de la sangre) puede desempeñar un papel importante en el daño pulmonar que se observa en algunos pacientes. Estas células cuando se activan en condiciones de falta de oxígeno (hipoxia) contribuyen al daño pulmonar.

¿Cuál es el objetivo de este estudio? El objetivo del presente proyecto es estudiar el efecto que tiene la falta de oxígeno en la evolución de la enfermedad y evaluar el efecto de los tratamientos de los que actualmente disponemos en la activación de los neutrófilos.

¿Por qué se le ha pedido que participe? Se te pide que participes en este estudio ya que tienes **Déficit de alfa-1 antitripsina**.

¿En qué consiste tu participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se te realizarán? Se te solicita permiso para utilizar con fines científicos **una muestra de sangre**.

ANEXOS

La participación en el presente proyecto no supone ninguna alteración del tratamiento que estés llevando (si lo tiene) y todo tratamiento que se te pueda poner será siempre bajo criterio médico.

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

El único riesgo previsible de tu participación será el mínimo riesgo que conlleva la extracción de una muestra de sangre, que incluye molestias, dolor, enrojecimiento e hinchazón y/o pequeños hematomas en el lugar del brazo donde se ha producido la extracción.

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

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

¿Qué pasará si decido no participar en este estudio?

Tu participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que decidas no participar en el estudio, esto no modificará el trato y seguimiento que de tu enfermedad realicen ni su médico ni el resto del personal sanitario que se ocupa de su enfermedad. Asimismo, podrás retirarte del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

¿A quién puedo preguntar en caso de duda?

Es importante que comentes con cualquiera de los investigadores de este proyecto las dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para tu participación. Asimismo, podrás solicitar cualquier explicación que desees sobre cualquier aspecto del estudio y tus implicaciones a lo largo del mismo, contactando con los investigadores que están realizando el proyecto, los **Drs. Amparo Escribano Montaner** en el teléfono **961 973 879** o el **Dr. Francisco Dasí Fernández** en el teléfono **676 515 598**.

Confidencialidad: Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con tu enfermedad será tratada con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Asimismo, 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 Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal, podrás ejercer tu derecho a acceder, rectificar o cancelar sus datos contactando con el investigador principal de este estudio.

ANEXOS

¿Qué pasará con las muestras biológicas obtenidas durante la investigación? Durante tu participación en este estudio, se te extraerá una muestra de sangre periférica. Esta muestra será siempre utilizada con fines científicos, pudiéndose utilizar si 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. Dicha muestra será conservada en una colección registrada en el ISCIII ubicada en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina piso 2E en un congelador de -80 °C durante un periodo de tiempo de 4 años. Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto titulado: Estudio del efecto de la hipoxia en la degranulación, en la producción de citoquinas y en el perfil oxidativo de los neutrófilos de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina.

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

Servicio: Pediatría

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

SE RECUERDA QUE EL APARTADO SIGUIENTE ÚNICAMENTE SE DEBE MANTENER CUANDO PROCEDA.

ANEXOS

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

Sí No

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

Sí No

Con esto doy mi conformidad para participar en este estudio,

Firma del paciente:

Firma del Investigador:

Fecha:

Fecha

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE PEDIÁTRICO (Entre 12-17 años)

Se te ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado “**Estudio del efecto de la hipoxia en la degranulación, en la producción de citoquinas y en el perfil oxidativo de los neutrófilos de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina**” que está siendo realizado por los **Drs. Amparo Escribano Montaner y Francisco Dasí Fernández** del Servicio de **Pediatría** y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Antecedentes: El déficit de alfa-1-antitripsina (DAAT) es un trastorno metabólico de carácter hereditario (que se transmite de padres a hijos) que está causado por cambios en una proteína que se llama alfa-1 antitripsina (AAT), la cual se produce principalmente en el hígado. La principal función de la AAT es proteger al tejido pulmonar del daño causado por una proteína llamada elastasa. A causa de esto, los pacientes pueden llegar a desarrollar problemas pulmonares y en el hígado que en algunos casos pueden ser graves. No obstante, debido entre otras causas al bajo número de pacientes afectados, no se dispone de tratamientos eficientes y definitivos que consigan mejorar la calidad de vida de los pacientes que la padecen. Investigaciones recientes han descubierto que los neutrófilos (un tipo de célula de la sangre) puede desempeñar un papel importante en el daño pulmonar que se observa en algunos pacientes. Estas células cuando se activan

ANEXOS

en condiciones de falta de oxígeno (hipoxia) contribuyen al daño pulmonar.

¿Cuál es el objetivo de este estudio? El objetivo del presente proyecto es estudiar el efecto que tiene la falta de oxígeno en la evolución de la enfermedad y evaluar el efecto de los tratamientos de los que actualmente disponemos en la activación de los neutrófilos.

¿Por qué se le ha pedido que participe? Se te pide que participes en este estudio ya que tienes **Déficit de alfa-1 antitripsina**.

¿En qué consiste tu participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se te realizarán? Se te solicita permiso para utilizar con fines científicos **una muestra de sangre**. La participación en el presente proyecto no supone ninguna alteración del tratamiento que estés llevando (si lo tiene) y todo tratamiento que se te pueda poner será siempre bajo criterio médico.

¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio? El único riesgo previsible de tu participación será el mínimo riesgo que conlleva la extracción de una muestra de sangre, que incluye molestias, dolor, enrojecimiento e hinchazón y/o pequeños hematomas en el lugar del brazo donde se ha producido la extracción.

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

¿Qué pasará si decido no participar en este estudio? Tu participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que decidas no participar en el estudio, esto no modificará el trato y seguimiento que de tu enfermedad realicen ni su médico ni el resto del personal sanitario que se ocupa de su enfermedad. Asimismo, podrás retirarte del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

¿A quién puedo preguntar en caso de duda? Es importante que comentes con cualquiera de los investigadores de este proyecto las dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para tu participación. Asimismo, podrás solicitar cualquier explicación que desees sobre cualquier aspecto del estudio y tus implicaciones a lo largo del mismo, contactando con los investigadores que están realizando el proyecto, los **Drs. Amparo Escribano Montaner** en el teléfono **961 973 879** o el **Dr. Francisco Dasí Fernández** en el teléfono **676 515 598**.

ANEXOS

Confidencialidad: Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con tu enfermedad será tratada con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Asimismo, 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 Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal, podrás ejercer tu 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 tu participación en este estudio, se te extraerá una muestra de sangre periférica. Esta muestra será siempre utilizada con fines científicos, pudiéndose utilizar si 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.

Dicha muestra será conservada en una colección registrada en el ISCIII ubicada en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina piso 2E en un congelador de -80 °C durante un periodo de tiempo de 4 años. Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto titulado: **Estudio del efecto de la hipoxia en la degranulación, en la producción de citoquinas y en el perfil oxidativo de los neutrófilos de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina.**

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

Servicio: Pediatría

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

ANEXOS

- 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

SE RECUERDA QUE EL APARTADO SIGUIENTE ÚNICAMENTE SE DEBE MANTENER CUANDO PROCEDA.

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

Sí No

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

Sí No

Con esto doy mi conformidad para participar en este estudio,

Firma del paciente:

Firma del Investigador:

Fecha:

Fecha

HOJA DE INFORMACIÓN AL VOLUNTARIO SANO PEDIÁTRICO **(Menores de 12 años)**

Se te ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado "**Estudio del efecto de la hipoxia en la degranulación, en la producción de citoquinas y en el perfil oxidativo de los neutrófilos de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina**" que está siendo realizado por los **Drs. Amparo Escribano Montaner y Francisco Dasí Fernández** del Servicio de **Pediatría** y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

ANEXOS

Antecedentes: El déficit de alfa-1-antitripsina (DAAT) es un trastorno metabólico de carácter hereditario (que se transmite de padres a hijos) que está causado por cambios en una proteína que se llama alfa-1 antitripsina (AAT), la cual se produce principalmente en el hígado. La principal función de la AAT es proteger al tejido pulmonar del daño causado por una proteína llamada elastasa. A causa de esto, los pacientes pueden llegar a desarrollar problemas pulmonares y en el hígado que en algunos casos pueden ser graves. No obstante, debido entre otras causas al bajo número de pacientes afectados, no se dispone de tratamientos eficientes y definitivos que consigan mejorar la calidad de vida de los pacientes que la padecen. Investigaciones recientes han descubierto que los neutrófilos (un tipo de célula de la sangre) puede desempeñar un papel importante en el daño pulmonar que se observa en algunos pacientes. Estas células cuando se activan en condiciones de falta de oxígeno (hipoxia) contribuyen al daño pulmonar.

¿Cuál es el objetivo de este estudio? El objetivo del presente proyecto es estudiar el efecto que tiene la falta de oxígeno en la evolución de la enfermedad y evaluar el efecto de los tratamientos de los que actualmente disponemos en la activación de los neutrófilos.

¿Por qué se le ha pedido que participe? Se le pide su participación en este estudio como **voluntario sano**.

¿En qué consiste tu participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se te realizarán? Se te solicita permiso para utilizar con fines científicos **una muestra de sangre**. La participación en el presente proyecto no supone ninguna alteración del tratamiento que estés llevando (si lo tiene) y todo tratamiento que se te pueda poner será siempre bajo criterio médico.

¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio? El único riesgo previsible de tu participación será el mínimo riesgo que conlleva la extracción de una muestra de sangre, que incluye molestias, dolor, enrojecimiento e hinchazón y/o pequeños hematomas en el lugar del brazo donde se ha producido la extracción.

¿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 la enfermedad y mejorar el pronóstico y el tratamiento de futuros pacientes.

¿Qué pasará si decido no participar en este estudio? Tu participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que

ANEXOS

decidas no participar en el estudio, esto no modificará el trato y seguimiento que de tu enfermedad realicen ni su médico ni el resto del personal sanitario que se ocupa de su enfermedad. Asimismo, podrás retirarte del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

¿A quién puedo preguntar en caso de duda? Es importante que comentes con cualquiera de los investigadores de este proyecto las dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para tu participación. Asimismo, podrás solicitar cualquier explicación que desees sobre cualquier aspecto del estudio y tus implicaciones a lo largo del mismo, contactando con los investigadores que están realizando el proyecto, los **Drs. Amparo Escribano Montaner** en el teléfono **961 973 879** o el **Dr. Francisco Dasí Fernández** en el teléfono **676 515 598**.

Confidencialidad: Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con tu enfermedad será tratada con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Asimismo, 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 Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal, podrás ejercer tu 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 tu participación en este estudio, se te extraerá una muestra de sangre periférica. Esta muestra será siempre utilizada con fines científicos, pudiéndose utilizar si 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. Dicha muestra será conservada en una colección registrada en el ISCIII ubicada en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina piso 2E en un congelador de -80 °C durante un periodo de tiempo de 4 años. Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto titulado: **Estudio del efecto de la hipoxia en la degranulación, en la producción de citoquinas y en el perfil**

ANEXOS

oxidativo de los neutrófilos de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina.

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

Servicio: Pediatría

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

SE RECUERDA QUE EL APARTADO SIGUIENTE ÚNICAMENTE SE DEBE MANTENER CUANDO PROCEDA.

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

Sí No

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

Sí No

Con esto doy mi conformidad para participar en este estudio,

Firma del paciente:

Firma del Investigador:

Fecha:

Fecha

ANEXOS

HOJA DE INFORMACIÓN AL VOLUNTARIO SANO PEDIÁTRICO (Entre 12-17 años)

Se te ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado "**Estudio del efecto de la hipoxia en la degranulación, en la producción de citoquinas y en el perfil oxidativo de los neutrófilos de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina**" que está siendo realizado por los **Drs. Amparo Escribano Montaner y Francisco Dasí Fernández** del Servicio de **Pediatría** y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Antecedentes El déficit de alfa-1-antitripsina (DAAT) es un trastorno metabólico de carácter hereditario (que se transmite de padres a hijos) que está causado por cambios en una proteína que se llama alfa-1 antitripsina (AAT), la cual se produce principalmente en el hígado. La principal función de la AAT es proteger al tejido pulmonar del daño causado por una proteína llamada elastasa. A causa de esto, los pacientes pueden llegar a desarrollar problemas pulmonares y en el hígado que en algunos casos pueden ser graves. No obstante, debido entre otras causas al bajo número de pacientes afectados, no se dispone de tratamientos eficientes y definitivos que consigan mejorar la calidad de vida de los pacientes que la padecen. Investigaciones recientes han descubierto que los neutrófilos (un tipo de célula de la sangre) puede desempeñar un papel importante en el daño pulmonar que se observa en algunos pacientes. Estas células cuando se activan en condiciones de falta de oxígeno (hipoxia) contribuyen al daño pulmonar.

¿Cuál es el objetivo de este estudio? El objetivo del presente proyecto es estudiar el efecto que tiene la falta de oxígeno en la evolución de la enfermedad y evaluar el efecto de los tratamientos de los que actualmente disponemos en la activación de los neutrófilos.

¿Por qué se le ha pedido que participe? Se le pide su participación en este estudio como **voluntario sano**.

¿En qué consiste tu participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se te realizarán? Se te solicita permiso para utilizar con fines científicos **una muestra de sangre**.

La participación en el presente proyecto no supone ninguna alteración del tratamiento que estés llevando (si lo tiene) y todo tratamiento que se te pueda poner será siempre bajo criterio médico.

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

ANEXOS

El único riesgo previsible de tu participación será el mínimo riesgo que conlleva la extracción de una muestra de sangre, que incluye molestias, dolor, enrojecimiento e hinchazón y/o pequeños hematomas en el lugar del brazo donde se ha producido la extracción.

¿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 la enfermedad y mejorar el pronóstico y el tratamiento de futuros pacientes.

¿Qué pasará si decido no participar en este estudio? Tu participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que decidas no participar en el estudio, esto no modificará el trato y seguimiento que de tu enfermedad realicen ni su médico ni el resto del personal sanitario que se ocupa de su enfermedad. Asimismo, podrás retirarse del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

¿A quién puedo preguntar en caso de duda? Es importante que comentes con cualquiera de los investigadores de este proyecto las dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para tu participación. Asimismo, podrás solicitar cualquier explicación que desees sobre cualquier aspecto del estudio y tus implicaciones a lo largo del mismo, contactando con los investigadores que están realizando el proyecto, los **Drs. Amparo Escribano Montaner** en el teléfono **961 973 879** o el **Dr. Francisco Dasí Fernández** en el teléfono **676 515 598**.

Confidencialidad: Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con tu enfermedad será tratada con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Asimismo, 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 Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal, podrás ejercer tu 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 tu participación en este estudio, se te extraerá una muestra de sangre periférica. Esta muestra será siempre utilizada con fines científicos, pudiéndose utilizar si lo autoriza en el marco de otros proyectos de investigación que tengan como objetivo el estudio

ANEXOS

de su enfermedad y que previamente hayan sido evaluados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital. Dicha muestra será conservada en una colección registrada en el ISCIII ubicada en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina piso 2E en un congelador de -80 °C durante un periodo de tiempo de 4 años. Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto titulado: **Estudio del efecto de la hipoxia en la degranulación, en la producción de citoquinas y en el perfil oxidativo de los neutrófilos de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina.**

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

Servicio: Pediatría

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

SE RECUERDA QUE EL APARTADO SIGUIENTE ÚNICAMENTE SE DEBE MANTENER CUANDO PROCEDA.

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

Sí No

ANEXOS

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:

Firma del Investigador:

Fecha:

Fecha

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE ADULTO

Se le ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado **“Estudio del efecto de la hipoxia en la degranulación, en la producción de citoquinas y en el perfil oxidativo de los neutrófilos de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina”** que está siendo realizado por los **Drs. Amparo Escribano Montaner y Francisco Dasí Fernández** del Servicio de **Pediatría** y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Antecedentes: El déficit de alfa-1-antitripsina (DAAT) es un trastorno metabólico de carácter hereditario (que se transmite de padres a hijos) que está causado por cambios en una proteína que se llama alfa-1 antitripsina (AAT), la cual se produce principalmente en el hígado. La principal función de la AAT es proteger al tejido pulmonar del daño causado por una proteína llamada elastasa. A causa de esto, los pacientes pueden llegar a desarrollar problemas pulmonares y en el hígado que en algunos casos pueden ser graves. No obstante, debido entre otras causas al bajo número de pacientes afectados, no se dispone de tratamientos eficientes y definitivos que consigan mejorar la calidad de vida de los pacientes que la padecen. Investigaciones recientes han descubierto que los neutrófilos (un tipo de célula de la sangre) puede desempeñar un papel importante en el daño pulmonar que se observa en algunos pacientes. Estas células cuando se activan en condiciones de falta de oxígeno (hipoxia) contribuyen al daño pulmonar.

¿Cuál es el objetivo de este estudio? El objetivo del presente proyecto es estudiar el efecto que tiene la falta de oxígeno en la evolución de la enfermedad y evaluar el efecto de los tratamientos de los que actualmente disponemos en la activación de los neutrófilos.

¿Por qué se le ha pedido que participe? Se le pide su participación en este estudio ya que ha sido diagnosticado de **Déficit de alfa-1 antitripsina**.

ANEXOS

¿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 sangre**.

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

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

El único riesgo previsible de su participación será el mínimo riesgo que conlleva la extracción de una muestra de sangre, que incluye molestias, dolor, enrojecimiento e hinchazón y/o pequeños hematomas en el lugar del brazo donde se ha producido la extracción.

¿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 el estudio, esto no modificará el trato y seguimiento que de su enfermedad realicen ni su médico ni 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 los investigadores que están realizando el proyecto, los **Drs. Amparo Escribano Montaner** en el teléfono **961 973 879** o el **Dr. Francisco Dasí Fernández** en el teléfono **676 515 598**.

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 Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal, podrá ejercer su derecho

ANEXOS

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 le extraerá una muestra de sangre periférica. 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. Dicha muestra será conservada en una colección registrada en el ISCIII ubicada en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina piso 2E en un congelador de -80 °C durante un periodo de tiempo de 4 años. Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto titulado: **Estudio del efecto de la hipoxia en la degranulación, en la producción de citoquinas y en el perfil oxidativo de los neutrófilos de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina.**

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

Servicio: Pediatría

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

ANEXOS

SE RECUERDA QUE EL APARTADO SIGUIENTE ÚNICAMENTE SE DEBE MANTENER CUANDO PROCEDA.

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

Sí No

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

Sí No

Con esto doy mi conformidad para participar en este estudio,

Firma del paciente:

Firma del Investigador:

Fecha:

Fecha

HOJA DE INFORMACIÓN AL VOLUNTARIO ADULTO SANO

Se le ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado **“Estudio del efecto de la hipoxia en la degranulación, en la producción de citoquinas y en el perfil oxidativo de los neutrófilos de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina”** que está siendo realizado por los **Drs. Amparo Escribano Montaner y Francisco Dasí Fernández** del Servicio de **Pediatría** y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Antecedentes: El déficit de alfa-1-antitripsina (DAAT) es un trastorno metabólico de carácter hereditario (que se transmite de padres a hijos) que está causado por cambios en una proteína que se llama alfa-1 antitripsina (AAT), la cual se produce principalmente en el hígado. La principal función de la AAT es proteger al tejido pulmonar del daño causado por una proteína llamada elastasa. A causa de esto, los pacientes pueden llegar a desarrollar problemas pulmonares y en el hígado que en algunos casos pueden ser graves. No obstante, debido entre otras causas al bajo número de pacientes afectados, no se dispone de tratamientos eficientes y definitivos que consigan mejorar la calidad de vida de los pacientes que la padecen. Investigaciones recientes han descubierto que los neutrófilos (un tipo de célula de la sangre) puede desempeñar un papel importante en el daño pulmonar que se observa en algunos pacientes. Estas células cuando se activan

ANEXOS

en condiciones de falta de oxígeno (hipoxia) contribuyen al daño pulmonar.

¿Cuál es el objetivo de este estudio? El objetivo del presente proyecto es estudiar el efecto que tiene la falta de oxígeno en la evolución de la enfermedad y evaluar el efecto de los tratamientos de los que actualmente disponemos en la activación de los neutrófilos.

¿Por qué se le ha pedido que participe? Se le pide su participación en este estudio como **voluntario sano**.

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

¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio? El único riesgo previsible de su participación será el mínimo riesgo que conlleva la extracción de una muestra de sangre, que incluye molestias, dolor, enrojecimiento e hinchazón y/o pequeños hematomas en el lugar del brazo donde se ha producido la extracción.

¿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 la 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 el estudio, esto no modificará el trato y seguimiento que de su enfermedad realicen ni su médico ni 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 los investigadores que están realizando el proyecto, los **Drs. Amparo Escribano Montaner** en el

ANEXOS

teléfono **961 973 879** o el **Dr. Francisco Dasí Fernández** en el teléfono **676 515 598**.

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 Orgánica 15/1999 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 le extraerá una muestra de sangre periférica. 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. Dicha muestra será conservada en una colección registrada en el ISCIII ubicada en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina piso 2E en un congelador de -80 °C durante un periodo de tiempo de 4 años. Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto titulado: **Estudio del efecto de la hipoxia en la degranulación, en la producción de citoquinas y en el perfil oxidativo de los neutrófilos de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina.**

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

Servicio: Pediatría

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

ANEXOS

- 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

SE RECUERDA QUE EL APARTADO SIGUIENTE ÚNICAMENTE SE DEBE MANTENER CUANDO PROCEDA.

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

Sí No

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

Sí No

Con esto doy mi conformidad para participar en este estudio,

Firma del paciente:	Firma	del
Investigador:		
Fecha:	Fecha	