

**NIVELES DE IL-17 EN PACIENTES CON SINTOMATOLOGÍA PULMONAR Y SU
ASOCIACIÓN CON ENFERMEDADES ESPECÍFICAS**

PAULA XIMENA LOSADA VANEGAS

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA
NEIVA - HUILA
2019

**NIVELES DE IL-17 EN PACIENTES CON SINTOMATOLOGÍA PULMONAR Y SU
ASOCIACIÓN CON ENFERMEDADES ESPECÍFICAS**

PAULA XIMENA LOSADA VANEGAS

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Médico

Asesor

CARLOS FERNANDO NARVAEZ ROJAS

Inmunología

Grupo de Parasitología y Medicina Tropical.
Semillero de Formación en Infección e Inmunidad SFI&I

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
NEIVA - HUILA
2019

Nota de aceptación:

Se certifica que este trabajo cumple
con los requisitos solicitados para
presentarse bajo la modalidad de
Proyecto de grado según los
requerimientos de la Universidad
Surcolombiana.



Firma del presidente del jurado



Firma del jurado

Firma del jurado

Neiva, Mayo del 2019

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis más sinceros agradecimientos:

Al Dr. Carlos Fernando Narváz, Inmunólogo, quien fue mi asesor para el desarrollo y culminación de esta investigación. Infinitas gracias pues sin su constante motivación y sinceros consejos no hubiera sido posible culminar con éxito este trabajo y esta etapa personal, hacia usted mi mayor admiración y respeto.

A mis padres y familiares por su apoyo incondicional, consejos, regaños y orientación personal. Por creer en mí y por soportar cada cambio emocional con los logros y fracasos que se presentaron en el camino.

A la Docente Dolly Castro Betancourt por su entrega y apoyo durante éste proceso de formación y por la motivación hacia la investigación.

Al Dr. Jhovani Lastra, neumólogo; por su apoyo y buena disposición durante el estudio.

A la Universidad Surcolombiana y al Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo, por su constante apoyo en la formación de médicos integrales centrados en solucionar las necesidades locales de su población.

Al Grupo de Parasitología y Medicina Tropical, Semillero de Formación en Infección e Inmunidad y auxiliares de laboratorio por su apoyo técnico, científico y motivacional para el desarrollo y culminación de esta investigación.

A todos los pacientes que hicieron parte del estudio y a las personas indirectamente involucradas, infinitas gracias.

Paula Ximena

TABLA DE CONTENIDO

1. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA	11
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. OBJETIVOS:	15
4.1 General:	15
4.2 Específicos:	15
5. MARCO TEÓRICO:.....	16
6. HIPÓTESIS	18
7. DISEÑO METODOLÓGICO	19
7.1 Tipo de estudio:.....	19
7.2 Lugar donde se realizó la investigación:.....	19
7.3 Población y muestra:.....	19
7.7 Técnicas y procedimientos para la recolección de información	20
7.8 Instrumento para la recolección de información (Ver anexo B)	20
7.9 Plan de procesamiento de datos o tratamiento de la información.	20
7.10 Tratamiento estadístico- Plan de análisis.....	21
7.11 Aspectos éticos: Incluir todas las consideraciones bioéticas que tuvieron en cuenta en la ejecución del proyecto.	21
8. RESULTADOS.....	22
9. DISCUSIÓN.....	23
10. CONCLUSIONES	25
11. RECOMENDACIONES	26
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	27
ANEXOS.	28
Tabla 1. Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes	36
Figura 1. Reproducción de la curva estándar del Kit de ELISA para medición de IL-17 recombinante humana.....	37
Figura 2. Niveles de IL-17 mediante ELISA	38

LISTADO DE FIGURAS

Tabla 1. Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes.

Figura 1. Reproducción de la curva estándar del Kit de ELISA para medición de IL-17 recombinante humana.

Figura 2. Niveles de IL-17 mediante ELISA.

Figura 3. Niveles de INF- γ mediante Citometría de flujo.

LISTADO DE ANEXOS

Anexo A. Consentimiento informado para participantes de investigación.

Anexo B. Instrumento para recolección de datos.

Anexo C. Cuadro de operacionalización de variables.

RESÚMEN

Las patologías pulmonares constituyen un frecuente motivo de consulta en nuestro medio y dentro de ellas se encuentra la tuberculosis pulmonar (TB) que constituye una causa de morbi-mortalidad importante a nivel mundial. En Colombia la infección por *Mycobacterium tuberculosis* es considerada un problema de salud pública pues anualmente el país reporta cerca de 12.000 casos de TB. La brecha entre incidencia estimada y reportada es cada vez menor, sin embargo, en los últimos años, esta última se ha mantenido sin muchos cambios. y los múltiples medios diagnósticos disponibles tienen limitaciones que no permiten un diagnóstico rápido para el manejo oportuno y certero de la enfermedad por lo que nuevas alternativas diagnósticas son constantemente investigadas y se hace necesaria la disponibilidad de métodos diagnósticos rápidos y marcadores que pronostiquen severidad. **Objetivos:** Aquí se propone evaluar si las magnitudes de concentración de la citocina IL-17 se relacionan con esta enfermedad y si podría ser un marcador diagnóstico del desarrollo de alguna de ellas. **Metodología:** Para el desarrollo del estudio se recolectaron muestras de 107 pacientes mayores de 15 años con sospecha de TB con baciloscopia seriada negativa que se les indicó fibrobroncoscopia y lavado broncoalveolar que fueron llevados a la unidad de neumología del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva durante los años 2014-2015. Cada uno de ellos fue documentado sobre el estudio y el procedimiento y firmaron el consentimiento informado. Mediante la técnica de ELISA se les cuantificó la cantidad de la citocina mencionada en las muestras de BAL. **Resultados:** En los pacientes con diagnóstico de TB no se detectaron niveles elevados de IL-17 en el líquido broncoalveolar de los pacientes estudiados pues en la mayoría de los valores se encontraron inferiores al límite de sensibilidad establecida para la técnica de ELISA utilizada. Las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes indican que los pacientes tuberculosos se encuentran entre la tercera y cuarta década de la vida y presentan síntomas como fiebre, tos en mayor frecuencia mientras que sudoración y hemoptisis fueron referidos por menos de la mitad de los pacientes.

Palabras clave: Tuberculosis Pulmonar, Interleuquina (IL) 17, Lavado Broncoalveolar, Micobacteria, Citoquina.

ABSTRACT

Pulmonary diseases are a frequent reason for consultation in our environment and among them is pulmonary tuberculosis (TB) which is a cause of major morbidity and mortality worldwide. Each year, the country reports about 12,000 cases of TB. The gap between estimated and reported incidence is decreasing, however, in recent years, the latter has remained without many changes. The multiple diagnostic means available that do not allow a rapid diagnosis for the timely management and diagnosis of the disease, so we must seek new diagnostic alternatives. **Objectives:** Here are the magnitudes of concentration of the cytokine IL-17 are related to this disease and if it could be a diagnostic marker of their development. **Methodology:** For the development of the study, samples were collected from 107 patients over 15 years of age with suspected negative smear-negative TB that indicated fibrobronchoscopy and bronchoalveolar lavage that were taken to the pulmonology unit of the University Hospital Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva during the years 2014-2015. Each of them was documented on the study and procedure and signed the informed consent. Using the ELISA technique, quantify the amount of the cytokine mentioned in BAL samples. **Results:** In the patients with TB diagnosis, no elevated levels of IL-17 were found in the bronchoalveolar fluid of the patients studied, since most of the values were within the limit established for the ELISA technique. The clinical and epidemiological characteristics of the patients indicated that the tuberculous patients are between the third and fifth decades of life and present symptoms as fever and cough, in greater frequency, while the sweating and hemoptysis were referred by less than half of the patients

Key words: Pulmonary tuberculosis, Interleukin(IL) 17, Bronchoalveolar lavage, Mycobacterium, Cytokine.

INTRODUCCIÓN

Colombia anualmente reporta alrededor de 12,000 casos de Tuberculosis.¹ Aunque es una patología ampliamente estudiada, aún no se cuenta con un método diagnóstico lo suficientemente rápido y sensible para proporcionar un tratamiento siempre oportuno. Esta es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* y su forma de contagio es mediante aerosoles emitidos desde la persona infectada que llegan hacia a la naso y orofaringe del contacto frecuente. Su evolución es lenta de forma que los síntomas pueden aparecer de forma crónica. La localización más frecuente es en el parénquima pulmonar, aunque cualquier órgano puede verse afectado.

Se conoce que la infección por el bacilo tuberculoso induce una respuesta inmune local dominada por Interferón gamma (IFN- γ).² El incremento sustancial de IL-17 se ha asociado al reclutamiento de neutrófilos y la activación del epitelio alveolar, por lo que podría jugar un papel crítico en la inmunidad frente al bacilo.³ Por ello, nuestro objetivo fue determinar si existen diferencias en los niveles de IL-17 en líquido broncoalveolar (BAL) de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar con BK seriados negativos vs pacientes no tuberculosos y comparar las características clínicas y epidemiológicas entre ambos grupos de pacientes.

Para lograr esto, se obtuvieron muestras de líquido broncoalveolar de pacientes que fueron llevados a fibrobroncoscopia bajo consentimiento informado y posteriormente se midió la citocina mediante la técnica de inmunoensayo ELISA con el kit comercial para IL-17. Durante el desarrollo del proyecto se encontraron algunas limitaciones como la dificultad de obtención del BAL debido a las características viscosas del mismo, la disponibilidad de reactivos para la medición de la citocina y la verificación de la patología mediante la historia clínica del Hospital Universitario de Neiva debido a que en repetidas ocasiones la información diligenciada se encuentra incompleta y la mayoría de las veces el diagnóstico se registra sólo con tener nexos epidemiológico y persistencia de los síntomas, por ende el reporte microbiológico del patógeno debió ser solicitado a la secretaría departamental en algunos casos.

Este estudio resulta de gran utilidad al representar la búsqueda de una alternativa diagnóstica que permita realizar un diagnóstico de Tuberculosis pulmonar que permita iniciar un tratamiento antituberculoso desde el inicio de la presentación de los síntomas sin que el paciente y el personal médico se vean obligados a iniciar tratamiento sin confirmación microbiológica y se deban limitar a la prueba terapéutica para poder esclarecer el diagnóstico.

1. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Múltiples estudios se realizan a diario con el fin de obtener un método diagnóstico rápido y efectivo para identificar la infección por el bacilo tuberculoso en personas que presentan sintomatología respiratoria crónica. El balance entre citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias ha demostrado que desempeñan un papel importante en la patogénesis y la actividad de la enfermedad, incluyendo la formación de granulomas, necrosis y reacciones de hipersensibilidad de tipo retardada⁽¹⁾

El trabajo de Küpeli y colaboradores realizado en el 2008 con la finalidad de evaluar la precisión diagnóstica de los niveles de TNF- α , IFN- γ e IL-2 en suero y LBA de los pacientes con tuberculosis pulmonar con baciloscopia negativa, usando como instrumento la técnica de ELISA, demostró que los niveles de TNF- α en LBA fueron significativamente elevados en el grupo de pacientes que resultaron con TBC en comparación con los pacientes que presentaban otras patologías pulmonares. Los niveles de TNF- α en BAL o de IFN- γ fueron mayores en los pacientes con enfermedad cavitaria en comparación con aquellos sin esta, no se encontraron diferencias significativas entre cavitaria y la TBC no cavitaria en los niveles de citoquinas. La sensibilidad y especificidad del TNF- α en LAB se encontró que eran del 73 y 76% respectivamente y se concluyó que en los casos de TBC con baciloscopia negativa el TNF- α en LAB puede ser una herramienta útil para identificar a sujetos sanos de aquellos pacientes enfermos con TBC ⁽¹⁾.

Es así como también se han realizado intentos de medición de citocinas proinflamatorias que parecieran ser prometedoras para resolver el problema planteado inicialmente. Molet S y cols⁽²⁾ desarrollaron un estudio en humanos donde informaron la detección de IL-17 en BAL no concentrado de sujetos asmáticos, con un límite detección de 15 pg/ml. Ese primer intento resultó ser esperanzador pues el asma es una patología netamente inflamatoria. Sin embargo; éste ha sido el único reporte exitoso en humanos donde pudo medirse la citocina ya que en cultivos in vitro bajo estímulo directo del bacilo se ha observado que la respuesta Th1 regula negativamente la producción de IL-17. ^(3, 4)

Thomas J. Scriba y colaboradores determinaron la influencia de niveles de IL-17 en la respuesta celular y de citocinas en respuesta frente al bacilo. Ellos encontraron que un incremento en los niveles de la IL-17 repercute en la expresión y secreción de INF- γ determinando de esta forma que es necesario un balance entre estas dos citocinas para lograr combatir efectivamente el microorganismo, sin embargo; los niveles detectados de IL-17 se obtuvieron mediante la medición en sangre periférica ya que en las muestras de líquido broncoalveolar (BAL) no fue posible detectar niveles de IL-17 pero si de IL-22 que

corresponde al mismo eje de respuesta inmune con citocinas para el reclutamiento de células tipo neutrófilo y contribuir a la inflamación.⁽⁵⁾

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Nuestro país cuenta con un gran número de patologías que son de difícil diagnóstico y a la vez son un problema a nivel mundial como la Tuberculosis, que ha llegado a convertirse incluso en un problema de salud pública. En el departamento del Huila aún se presentan cifras relativamente altas de la infección en comparación a otros sitios del país. Es así que para el año 2014 se registró una incidencia de 27,1 casos por cada 100.000 habitantes; y en el 2015 la incidencia fue de 22,4 casos por cada 100.000 habitantes según lo reportan los boletines epidemiológicos del instituto nacional de salud y en la actualidad se siguen reportando alrededor de 12.000 casos anuales. En la práctica se encuentran disponibles métodos diagnósticos costosos, poco sensibles o que toman mucho tiempo para obtener los resultados como lo es la microscopía, la reacción en cadena de polimerasa (PCR), el cultivo de esputo, la fibrobroncoscopia y el lavado broncoalveolar (LBA).

El cultivo para TBC que es el “Gold estándar”, tiene una sensibilidad del 85% y una especificidad de 98%, un resultado positivo asegura el diagnóstico de TBC, con un alto valor predictivo positivo pero su desventaja más grande radica en el largo tiempo que se requiere para conocer los resultados, que es de 2 a 3 meses⁽⁶⁾.

Debido a la baja sensibilidad, alto costo y largo tiempo necesario para la obtención de los resultados, representan inconvenientes en el momento del diagnóstico oportuno y eficaz.

3. JUSTIFICACIÓN

Dentro de las patologías que afectan el pulmón la infección por *Mycobacterium tuberculosis* es una de las de mayor frecuencia. Se conoce que induce una respuesta inmune local dominada por Interferón gamma (IFN- γ) e interleucina (IL)-17 siendo ésta última recientemente descrita. Niveles aumentados de IL-17 ayuda al reclutamiento de células polimorfonucleares tipo neutrófilos y al tiempo activación del epitelio alveolar, por lo que podría jugar un papel crítico en la inmunidad frente al bacilo. La detección de esta citocina por ELISA es poco costosa, rápida y confiable, el costo de un kit con 100 muestras se encuentra alrededor de \$649 dólares que equivale a 6.49 dólares cada muestra. La medición directa del IFN- γ en el LBA podría tener la ventaja de ser mucho más rápido de realizar y con esto obtener apoyos diagnósticos tempranos de la enfermedad para inicios oportunos de tratamiento ⁽⁶⁾.

Es por eso que la pregunta que se desea responder con este trabajo es: ¿Hay diferencias en los niveles de IL-17 en líquido broncoalveolar entre pacientes con patologías pulmonares como TB, neoplasias, y VIH? ¿Podría esta expresión diferencial de IL-17 localmente producido ser usada como un método diagnóstico complementario temprano para alguna de ellas? Este trabajo contribuirá con el desarrollo de nuevos marcadores predictores de diagnóstico y posible severidad, además fortalecerá la capacidad tecnológica para el diagnóstico y análisis fisiopatológico de cada una de las patologías.

4. OBJETIVOS:

4.1 General:

- Determinar si existen diferencias en los niveles de IL-17 en líquido broncoalveolar de pacientes con sintomatología pulmonar.

4.2 Específicos:

- Comparar las características clínicas y epidemiológicas entre los dos grupos de pacientes.
- Establecer el límite de sensibilidad en el laboratorio para la medición de IL-17 mediante ELISA.

5. MARCO TEÓRICO:

Dentro de las enfermedades infecciosas que afectan el pulmón se encuentra la tuberculosis (TB). Esta es una enfermedad infecciosa causada por cepas de bacterias conocidas como micobacterias. La enfermedad afecta más comúnmente a los pulmones y puede ser fatal si no se trata. Es la segunda causa de mortalidad, después del sida, a nivel mundial, causada por un agente infeccioso y la primera causa de muerte en pacientes VIH positivos. Se cree que un tercio de la población mundial han sido infectados con tuberculosis.⁽⁷⁾

Aunque la incidencia mundial de la tuberculosis ha disminuido paulatinamente durante los últimos 13 años (1- 5% por año), la carga de la enfermedad sigue siendo muy importante, 3.3 millones de personas con tuberculosis no fueron diagnosticadas o reportadas. De continuar la progresión de la enfermedad como hasta ahora, se estima que para el año 2020 cerca de un billón de personas se infectarán, 200 millones enfermarán y 35 millones morirán.⁽⁸⁾ Ésta infección es dada por un bacilo aerobio inmóvil, no formador de esporas, con un contenido elevado de lípidos de alto peso molecular en la pared celular que actúan como factores de virulencia y le permiten la supervivencia. La forma más efectiva de transmisión del *M. Tuberculosis* es mediante gotitas de saliva y el esputo de individuos con lesiones pulmonares abiertas.

La progresión desde infección a enfermedad leve o grave depende en gran medida de diversos factores además de la presencia del bacilo; si bien muchos están relacionados con él como es la virulencia de la cepa, el tamaño del inóculo, el punto de inoculación; no hay duda también que la resistencia varía con el hombre, dependiente de factores genéticos y no genéticos.

El macrófago alveolar es la primera célula que entra en contacto con el *Mycobacterium tuberculosis*. Esta célula procesa y presenta antígenos micobacterianos a los LT CD4+. El macrófago además produce citocinas como TNF- α , IL - 1 β , IL-6 e IL-12p70, esta última citocina induce a los LT CD4+ a producir IFN- γ (perfil Th1). El IFN- γ potencia la capacidad del macrófago de destruir intracelularmente la micobacteria por aumento de la expresión de iones como el superóxido y peróxido, además de reactivos intermediarios del nitrógeno como el óxido nítrico.

Estudios han demostrado que durante la tuberculosis primaria tanto IFN- γ e IL-17 son inducidas: ambas son citoquinas inflamatorias potentes capaces de inducir la expresión de quimiocinas que promueven el reclutamiento de células y la organización de granulomas en toda infección. Durante la fase crónica, un equilibrio entre las respuestas Th1 y Th17 se debe lograr para controlar el crecimiento bacteriano y limitar la inmunopatología, es así como un cambio de la respuesta a la excesiva producción de IL-17 puede sostener extenso reclutamiento de neutrófilos y daño tisular. Por lo tanto, la regulación de las respuestas Th1 y Th17 durante la tuberculosis es esencial para promover la inmunidad anti-micobacteriana y evitar extensas consecuencias inmunopatológicas⁽⁹⁾. Diversos experimentos se han realizado para evaluar diferentes citocinas principalmente en muestras de sangre periférica evaluar los niveles de IL-17 en

BAL proporcionaría una mayor aproximación su comportamiento en la enfermedad.

6. HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis se basa en que la respuesta inmunológica de pacientes infectados por *Mycobacterium Tuberculosis* con diagnóstico de Tuberculosis pulmonar que tuvieron baciloscopias seriadas negativas y que se les confirmó el diagnóstico mediante hallazgo microbiológico (Cultivo y/o PCR) debería generar una elevación de las concentraciones de IL-17 presente en líquido broncoalveolar para lograr una respuesta inmune efectiva en contra del patógeno ya que dicha citocina juega un papel importante en el reclutamiento de células inmunitarias como los polimorfonucleares tipo neutrófilos.

7. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1 Tipo de estudio: Este es un estudio de tipo observacional descriptivo de casos debido a que no se intervinieron directamente a los pacientes, transversal pues fueron incluidos los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión durante el periodo de 2014 a 2015.

7.2 Lugar donde se realizó la investigación: La obtención y recolección de las muestras fue realizada en la unidad de neumología del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva y la medición de la citocina fue realizada en el Laboratorio de Infección e Inmunidad de la facultad de salud de la Universidad Surcolombiana.

7.3 Población y muestra: Los pacientes de este estudio asistieron al servicio de Neumología del Hospital Universitario de Neiva, durante el periodo de 2014 a 2015. Para el cálculo de la muestra se tomaron en cuenta las características específicas del diseño del estudio y una aproximación muy general estima que un tamaño debe ser suficiente cuando hay mínimo 10 individuos en cada casilla marginal de la tabla 2 x 2, aunque además se calculó teniendo en cuenta un porcentaje de error del 5% y un nivel de confianza de 95%, por lo que el tamaño calculado de la muestra fue de 285 pacientes inicialmente.

7.4 Criterios de inclusión en pacientes de grupo sospecha de tuberculosis

- Paciente adulto con orden de fibrobroncoscopia solicitada por el médico tratante que sea ingresado al servicio de neumología del Hospital Universitario de Neiva.
- Paciente sintomático respiratorio (tos de más de 15 días), acompañado de síntomas constitucionales dados por hiporexia, sudoración, pérdida de peso.
- Paciente con Baciloscopias seriadas negativas.
- Pacientes mayores de 15 años.
- Pacientes con sospecha de primo infección por *Mycobacterium Tuberculosis*.

7.5 Criterios de inclusión en pacientes de grupo no tuberculosis

- Paciente que consulta al servicio de neumología del Hospital Universitario de Neiva con orden de fibrobroncoscopia solicitada por el médico tratante.
- Paciente con enfermedad pulmonar diferente a tuberculosis (Infección por HIV, Neoplasia pulmonar, neumonía).
- Pacientes mayores de 15 años.

7.6 Criterios de exclusión de grupo sospecha tuberculosis

- No obtención del consentimiento informado por escrito.
- Baciloscopia positiva.
- Arritmias en el momento del procedimiento.
- Angina inestable.
- Alteraciones fisiológicas que no permitan el procedimiento.
- Alteraciones anatómicas que impidieran la realización del procedimiento.
- Pacientes con enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso sistémico, espondiloartropatías, artritis reumatoidea, sarcoidosis).

7.7 Técnicas y procedimientos para la recolección de información

Todos los voluntarios incluidos firmaron consentimiento informado para poder ser ingresados al estudio y posteriormente se diligenció un formato que permitió la recolección de datos clínicos y epidemiológicos de importancia para la investigación (Anexo A).

La obtención de la muestra se realiza mediante fibrobroncoscopia la cual es realizada por un neumólogo entrenado quien hace parte del estudio, utilizando un equipo especializado flexible, disponible en el servicio de Neumología del Hospital Universitario de Neiva. Para el lavado broncoalveolar se usaron 80cm de solución salina normal y el líquido recolectado fue enviado a laboratorio clínico y patológico institucional para la realización de las PCR para micobacterias, coloraciones especiales BK y cultivo. 20mL del líquido recolectado fue llevado al Laboratorio de Infección e Inmunidad de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana, en donde la muestra codificada fue filtrada, centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos (454 xg) y de estas muestras alicuotadas pasaron a ser almacenadas a -70 °C. El sobrenadante obtenido fue utilizado para la detección de IL-17 analizada por ELISA (estuche comercial para la detección de IL-17 (DuoSet, RyD, Cats: DY317-05).

7.8 Instrumento para la recolección de información (Ver anexo B)

7.9 Plan de procesamiento de datos o tratamiento de la información.

La información obtenida mediante el instrumento fue tabulada en una tabla de Excel. A cada paciente le fue asignado un código según el orden cronológico en que fue tomada la muestra y para el análisis de los datos a las variables dicotómicas se les asignó los número 1 y 0 para respuestas afirmativas y negativas; respectivamente.

7.10 Tratamiento estadístico- Plan de análisis

En el presente estudio para el análisis de variables cualitativas y cuantitativas se empleó estadística descriptiva. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPadPrism 5.0. Para el análisis de los grupos independientes se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. El grado de correlación entre dos variables fue hallado mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Se obtuvo el análisis de frecuencias mediante el test exacto de Fischer. En todos los casos se tomó como significativo un valor de $P < 0.05$.

7.11 Aspectos éticos: Incluir todas las consideraciones bioéticas que tuvieron en cuenta en la ejecución del proyecto.

De acuerdo con los principios establecidos en la Resolución 8430 de 1993, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, este estudio se desarrolló bajo las siguientes consideraciones bioéticas:

- la investigación se desarrolló cuando se obtuvo la autorización del representante legal de la institución en donde se realizó la investigación; el consentimiento informado de los participantes y la aprobación del proyecto por parte del comité de ética.
- En cuanto al consentimiento informado se le expresaron los riesgos y las garantías de seguridad a cada uno de los participantes. Posterior a esto, el paciente acepta pertenecer al estudio proporcionando su firma o en caso especial su representante legal.

La decisión de participar o retirarse fue totalmente voluntaria. Los investigadores se comprometieron a guardar la confidencialidad de los datos que se obtuvieron.

8. RESULTADOS

Para el desarrollo del presente estudio 107 pacientes durante el periodo 2013 a 2015 en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión por lo tanto fueron incluidos dentro del estudio y fueron divididos en dos grandes grupos: Pacientes con Tuberculosis (TB) pulmonar y pacientes con enfermedad diferente a TB pulmonar. El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico Prisma 5.0

No se encontraron diferencias en la edad, peso, IMC y los signos y síntomas relacionados con el cuadro clínico pulmonar entre los pacientes con diagnóstico de Tuberculosis pulmonar y los pacientes con patologías pulmonares diferentes a tuberculosis. (**Tabla 1.**)

Se reprodujo la curva estándar del Kit de ELISA para medición de IL-17 recombinante humana en nuestro laboratorio, establecimos el punto de corte para la lectura de las concentraciones de dicha citocina en 3 pg/mL (**Figura 1.**) Posteriormente fueron seleccionados 60 pacientes de forma aleatoria para la medición de IL-17 del total de muestras recolectadas debido a la cantidad de reactivo que se encontraba en el laboratorio.

Al realizar la lectura de los ensayos la mayoría de las muestras presentan niveles no detectables; es decir, inferiores al límite de sensibilidad establecido al reproducir inicialmente la curva estándar. Sin embargo, los niveles que superan el punto de corte tampoco alcanzan valores significativamente altos y no se encuentra diferencia de las concentraciones obtenidas entre los dos grupos. (**Figura 2.**)

Debido a que el INF- γ es la citocina clásicamente descrita en la infección por *Mycobacterium Tuberculosis* se decidió medirla en los pacientes mediante citometría de flujo y se encontró que los pacientes con Tuberculosis pulmonar no produjeron INF- γ durante la infección o sus concentraciones son tan bajas que no son detectables en nuestro ensayo mientras que en los pacientes con una entidad diferente se detectó la citocina pero en pocas cantidades lo que no permite establecer una diferencia significativa (**Figura 3.**)

9. DISCUSIÓN

Nuestro análisis muestra que los pacientes con diagnóstico de tuberculosis se encuentran en promedio en la quinta década de la vida y se encuentran con índice de masa corporal dentro del rango de la normalidad, lo que concuerda con datos nacionales donde se reporta que esta enfermedad es una de las cinco causas principales de muerte en las mujeres entre los 15 y los 44 años.⁽¹⁰⁾

En este estudio se detectaron bajas concentraciones de IL-17 en las muestras de lavado broncoalveolar de 60 pacientes, la mayoría de las mediciones obtenidas se encontraron por debajo del límite de sensibilidad establecido para nuestro ensayo. Éstos resultados fueron inesperados debido a lo observado por Scriba TJ y cols⁽³⁾; Quienes detectaron mRNA de células T asociadas a IL-17 en el parénquima pulmonar y respuesta Th17 en muestras de sangre periférica de ratones infectados por el bacilo tuberculoso. Por lo que esperábamos mayores concentraciones de dicha citocina en el líquido broncoalveolar.

En los experimentos realizados por Park H y cols⁽¹¹⁾; los bajos niveles de IL-17 en BAL podrían ser debidos a una inhibición de IL-1 en el pulmón afectado. En experimentos de cultivos in vitro, la respuesta Th1 es predominante en la infección por TB pulmonar y puede inhibir la expresión de IL-17.

Otros estudios donde los pacientes con inflamación neutrofílica de la vía aérea luego de una exposición a polvo han registrado que los niveles de ésta proteína en BAL han sido extremadamente bajos e incluso indetectables, excepto en aquellos que cursan con inflamación más severa.⁽¹²⁾ Lo que podría explicar nuestros resultados, ya que los pacientes estudiados con diagnóstico de TB pulmonar tuvieron baciloscopias seriadas negativas, es decir; el bacilo no fue identificado mediante microscopio lo que se relacionaría con la cantidad de bacilos presentes y por ende una respuesta inmune no tan severa. Sin embargo, no podemos establecer la severidad del cuadro de cada paciente ya que no fue una variable incluida en nuestro estudio.

El INF- γ es la citocina clásicamente descrita de la respuesta celular Th1 que predomina en la infección activa por *Mycobacterium Tuberculosis* y por eso decidimos medirla en nuestros pacientes. Sin embargo; tampoco obtuvimos niveles detectables de INF- γ en nuestros grupos de estudio. Los niveles bajos de ambas citocinas podrían verse afectados por la calidad de la muestra. Molet S y cols⁽²⁾ realizaron un estudio en humanos donde informaron la detección de IL-17 en BAL no concentrado de sujetos asmáticos, con un límite detección de 15 pg/ml, el único reporte exitoso en humanos ya que en cultivos in vitro bajo estímulo directo del bacilo se ha observado que la respuesta Th1 regula negativamente la producción de IL-17^(3, 4). Estos datos implican que los niveles de IL-17 en BAL de la mayoría de los sujetos, incluso en ausencia de citoquinas Th1 inhibitorias, son demasiado bajos para detectar directamente mediante ELISA.⁽¹³⁾ Esto podría resolverse si concentramos cada una de las muestras del BAL.

Durante el desarrollo de este estudio se presentaron algunas limitaciones como la dificultad de obtención de un adecuado volumen del BAL para poder ser medido en forma satisfactoria debido a las características viscosas del mismo. La disponibilidad de

reactivos para la medición de la citocina y la verificación de la patología mediante la historia clínica del Hospital Universitario de Neiva fueron factores que influyeron en nuestro resultados debido a que en repetidas ocasiones la información diligenciada se encuentra incompleta y la mayoría de las veces el diagnóstico se registra sólo con tener nexos epidemiológicos y persistencia de los síntomas, por ende el reporte microbiológico del patógeno debió ser solicitado a la secretaría departamental en algunos casos. Esto en alguna medida influyó en el número de pacientes que lograron ser incluidos finalmente en el estudio.

10. CONCLUSIONES

No se encontraron diferencias en los niveles de IL-17 del líquido broncoalveolar entre los pacientes estudiados pues en la mayoría de ellos los niveles no fueron detectables mediante ELISA. Esto tal vez se deba a la composición del BAL lo que ocasionaría una baja concentración de la citocina. Los pacientes infectados por el Mycobacterium Tuberculosis se encuentran en las etapas más productivas de la vida y el peso en la mayoría de ellos no se afectó considerablemente por la enfermedad. Los síntomas clínicos manifestados por ambos grupos fueron similares debido a que todos los pacientes presentaban alguna patología pulmonar lo que no permite establecer diferencias entre ellos. El bajo número de pacientes analizados puede ser un factor limitante para poder generalizar nuestros resultados a la población con diagnóstico de TB pulmonar.

11.RECOMENDACIONES

Es necesario realizar nuevos estudios que permitan establecer una mejor medición de IL-17 teniendo en cuenta la severidad de la enfermedad, una mejor calidad de la muestra mediante concentración de la misma y un aumento en el número de pacientes con diagnóstico de TB pulmonar. A su vez, la medición de otras citocinas relacionadas con la respuesta inflamatoria local deberá caracterizarse para relacionar el comportamiento entre sí.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Kupeli E, Karnak D, Beder S, Kayacan O, Tutkak H. Diagnostic accuracy of cytokine levels (TNF-alpha, IL-2 and IFN-gamma) in bronchoalveolar lavage fluid of smear-negative pulmonary tuberculosis patients. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2008;75(1):73-8.
2. Molet S, Hamid Q, Davoineb F, Nutku E, Tahaa R, Pagé N, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*.108(3):430-8.
3. Scriba TJ, Kalsdorf, B., Abrahams, D.-A., Isaacs, F., Hofmeister, J., Black, G., ... Hanekom, W. A. . Distinct, specific IL-17 and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *Journal of immunology*. 2008;180(3):1962–70.
4. Jurado JO, Pasquinelli V, Alvarez IB, Peña D, Rovetta AI, Tateosian NL, et al. IL-17 and IFN-γ expression in lymphocytes from patients with active tuberculosis correlates with the severity of the disease. *Journal of Leukocyte Biology*. 2012;91(6):991-1002.
5. Scriba TJ, Kalsdorf B, Abrahams D-A, Isaacs F, Hofmeister J, Black G, et al. Distinct, Specific IL-17- and IL-22-Producing CD4⁺ T Cell Subsets Contribute to the Human Anti-Mycobacterial Immune Response. *The Journal of Immunology*. 2008;180(3):1962-70.
6. Jafari C KP, Sotgiu G, Ernst M, Lange C;. Impact of a Mycobacterium tuberculosis-specific interferon-γ release assay in bronchoalveolar lavage fluid for a rapid diagnosis of tuberculosis. *Journal of Internal Medicine*.270(5):500.
7. OMS. Tuberculosis. Marzo de 2015 Nota descriptiva N°104; .
8. WHO. Report 2006
9. Torrado E, and Andrea M. Cooper. . "IL-17 and Th17 Cells in Tuberculosis." *Cytokine & growth factor reviews*. (2010); 21.6 455–62.
10. Lopez SFMP. TUBERCULOSIS. Protocolo de vigilancia en salud pública- Min Salud Colombia. 2016;04:2-42.
11. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y-H, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology*. 2005;6:1133.
12. Laan M, Palmberg L, Larsson K, Lindén A. Free, soluble interleukin-17 protein during severe inflammation in human airways. *European Respiratory Journal*. 2002;19(3):534-7.
13. Snell GI, Levvey BJ, Zheng L, Bailey M, Orsida B, Williams TJ, et al. Interleukin-17 and Airway Inflammation: A Longitudinal Airway Biopsy Study After Lung Transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*.26(7):669-74.



ANEXOS.

ANEXO A. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPANTES DE INVESTIGACIÓN

NIVELES DE IL-17 EN PACIENTES CON SINTOMATOLOGÍA PULMONAR Y SU ASOCIACIÓN CON ENFERMEDADES ESPECÍFICAS

UNIVERSIDAD SUCOLOMBIANA- FACULTAD DE SALUD

HOSPITAL UNIVERSITARIO HERNANDO MONCALEANO PERDOMO

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Carlos F. Narváez

SEDE DONDE SE REALIZA EL ESTUDIO: Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

A usted se le está invitando a participar en el estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregara una copia firmada y fechada.

Objetivo del estudio: Determinar si hay elevación del nivel de IL-17 en lavado broncoalveolar en pacientes con sospecha de TBC pulmonar y establecer su sensibilidad y especificidad frente a los métodos diagnósticos localmente.

Justificación del estudio Este estudio evaluara una aproximación diagnostica complementaria temprana para tuberculosis pulmonar que se espera permita el inicio oportuno del tratamiento.

Procedimientos del estudio Si usted accede a participar en este estudio, se le pedirá responder preguntas y el consentimiento para la manipulación de las muestras obtenidas en la fibrobroncoscopia.

Aclaraciones: Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria. No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación. Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando

el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad. No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio. No recibirá pago por su participación. En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable. La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

Si tiene alguna pregunta o si desea alguna aclaración por favor comunicarse con la Dra a Marcela Castro al teléfono 3112579527 y a la Dra Carol Salcedo al teléfono 3177540349.

Yo, _____ c.c N° _____ de _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria por el investigador que me entrevisto. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos, por lo tanto deseo participar voluntariamente en el proyecto de investigación.

Nombres y Apellidos del Participante

Firma del Participante.

C.C N°

Nombre del Testigo

Firma Del Testigo.

C.C N°

Esta parte debe ser completada por el investigador (o su responsable).

He explicado al Sr.(a) _____ el propósito de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implican su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella (Resolución 8430 de 1993) una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del Investigador

Fecha

ANEXO B. INSTRUMENTO PARA RECOLECCIÓN DE DATOS

NIVELES DE IL-17 EN PACIENTES CON SINTOMATOLOGÍA PULMONAR Y SU ASOCIACIÓN CON ENFERMEDADES ESPECÍFICAS

UNIVERSIDAD SUCOLOMBIANA- FACULTAD DE SALUD
HOSPITAL UNIVERSITARIO HERNANDO MONCALEANO PERDOMO

Nombre: _____ Fecha de ingreso _____
 Edad: ____ años HC _____ CC _____
 Sexo: Femenino ____ Masculino ____ Teléfono _____

1- Edad

< 65 años >65 años

2- Peso _____ Talla _____

3- Antecedente epidemiológico

• Antecedente de contacto con personas con Tuberculosis Si ____ No ____

• Antecedente de vacunación con BCG Si ____ No ____

Hace cuánto tiempo _____

• Antecedente de prueba de tuberculina Si ____ No ____

Hace cuánto tiempo _____

4- Comorbilidades

• Hipertensión Arterial Si ____ No ____

• Diabetes Mellitus Si ____ No ____

• EPOC Si ____ No ____

• Enf hematológicas crónicas (A.falciforme) Si ____ No ____

• ERC Si ____ No ____

• Enf cardiovascular grave Si ____ No ____

• Enf autoinmune Si ____ No ____ Cual _____

Tratamiento actual Si ____ No ____ Cual _____

• Antecedente de tuberculosis: Si ____ No ____

Hace cuanto tiempo _____

Recibió tratamiento Si ____ No ____ Cual _____

- Infección por retrovirus humano (VIH) Si____ No____

Hace cuanto tiempo _____

Conteo Linfocitos CD4 Si____ No____ valor _____

Carga viral Si____ No____ valor _____

Tratamiento Si____ No____ Cual _____

- Otras infecciones en este momento Si____ No____

Cual _____

5- Anamnesis – Examen físico (alguno de estos)

- Sudoración Si____ No____ día de inicio _____ duración _____
- Hiporexia Si____ No____ día de inicio _____ duración _____
- Fiebre Si____ No____ día de inicio _____ duración _____
- Tos Si____ No____ día de inicio _____ duración _____
- Hemoptisis Si____ No____ día de inicio _____ duración _____
- Pérdida de peso Si____ No____ día de inicio _____ duración _____
- Disnea Si____ No____ día de inicio _____ duración _____

6- Lugar de atención

- Sala general- Hospitalización (observación) Si____ No____
- UCI (unidad de cuidados intensivos) Si____ No____

7- Hallazgos adicionales en la Fibrobroncoscopia

8- Condición al final de la estancia hospitalaria

- Vivo Si____ No____

9- Seguimiento

- Recibe tratamiento anti- TB Si____ No____
- Medicamentos anti-TBC actuales: _____
- Complicaciones: _____
- BK en cultivo Positivo _____ Negativo _____
- Cultivo para micobacterias Positivo _____ Negativo _____

Parámetro	1 MES	2 MES	3 MES
Suspensión de tratamiento			
Nueva hospitalización			
Diagnostico clínico radiológico y bacteriológico			
Otros datos			

ANEXO C. CUADRO DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

VARIABLE	DEFICIÓN OPERACIONAL	CATEGORÍAS	NIVEL DE MEDICIÓN	INDICADOR
EDAD	Tiempo cronológico del paciente desde el nacimiento hasta el momento del lavado broncoalveolar	Número de años	RAZÓN	PROMEDIO
PESO	Medida obtenida a partir de la medición sobre una báscula.	Kilogramos	INTERVAL	PORCENTAJE
FIEBRE	Valor de la temperatura corporal presentada por el paciente durante los síntomas medida con termómetro.	Grados centígrados	RAZÓN	PROMEDIO
Niveles de IL-17	Niveles obtenidos de las muestras por medio de la lectura de la placa de ELISA con espectrofotómetro	pg/dl	RAZÓN	PROMEDIO EN PICOGRAMOS
SUDORACIÓN	Valoración subjetiva dada por el mismo paciente sobre sudoración excesiva.	Presente o ausente	ORDINAL	FRECUENCIA, PORCENTAJE.
HIPOREXIA	Valoración subjetiva dada por el mismo paciente sobre disminución del apetito.	Presente o ausente	ORDINAL	FRECUENCIA, PORCENTAJE.
HEMOPTISIS	Valoración subjetiva dada por el mismo paciente sobre episodios de vómito con sangre durante el periodo de síntomas.	Presente o ausente	ORDINAL	FRECUENCIA, PORCENTAJE.
TOS	Valoración subjetiva dada por el mismo paciente sobre tos durante el periodo de síntomas.	Presente o ausente	ORDINAL	FRECUENCIA, PORCENTAJE.

PÉRDIDA DE PESO	Valoración subjetiva dada por el mismo paciente disminución en el peso corporal durante el periodo de síntomas en comparación al tiempo sin enfermedad.	Presente o ausente	ORDINAL	FRECUENCIA, PORCENTAJE.
DISNEA	Valoración subjetiva dada por el mismo paciente sobre sensación de falta de aire al realizar actividades durante el periodo de síntomas.	Presente o ausente	ORDINAL	FRECUENCIA, PORCENTAJE.

ANEXO D. LISTADO DE FIGURAS

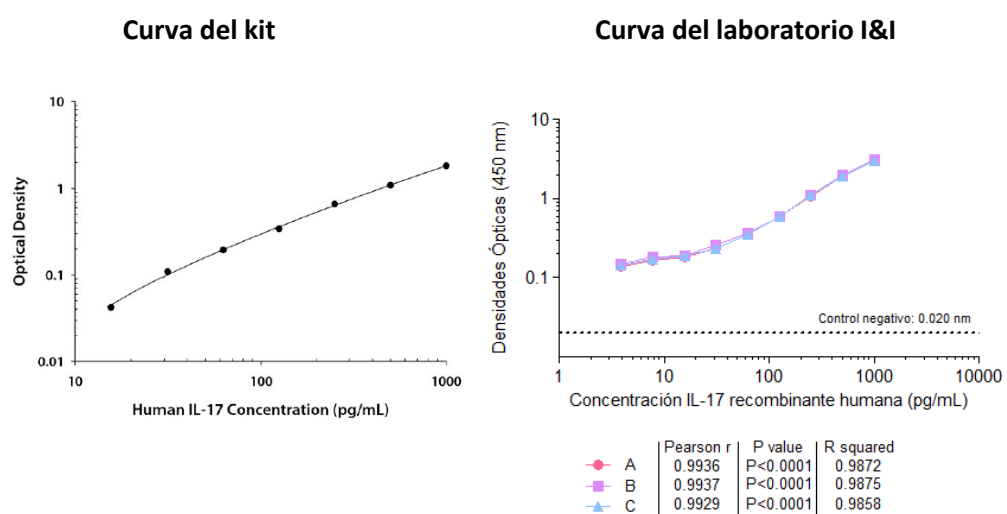
Tabla 1. Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes.

PARÁMETROS	TB PULMONAR	ENFERMEDADES NO TB PULMONAR	P
<i>n total= 107</i>	<i>n= 17</i>	<i>n=90</i>	
<i>Edad[Años] (mediana, rango)</i>	41 (21-67)	48 (17-88)	0,1585 a
<i>Peso [Kg] (mediana, rango)</i>	53 (42-75)	60 (20-83)	0,5008 a
<i>IMC (mediana, rango)</i>	19 (15-27)	21 (12-39)	0,1884 a
<i>Sudoración (n, %)</i>	4 (23%)	16 (17%)	0.7330 b
<i>Hiporexia (n, %)</i>	6 (35%)	16 (17%)	0.1033 b
<i>Fiebre (n, %)</i>	12 (70%)	57 (63%)	0.5895 b
SIGNS Y SYMPTOMS <i>Tos(n, %)</i>	13 (76%)	81 (90%)	0.2680 b
<i>Hemoptisis (n, %)</i>	5 (29%)	16 (17%)	0.3114 b
<i>Pérdida de peso (n, %)</i>	6 (35%)	41(45%)	0.5989 b
<i>Disnea (n, %)</i>	6 (35%)	50(55%)	0.1933 b

^a Mann Whitney test, ^b Fisher test

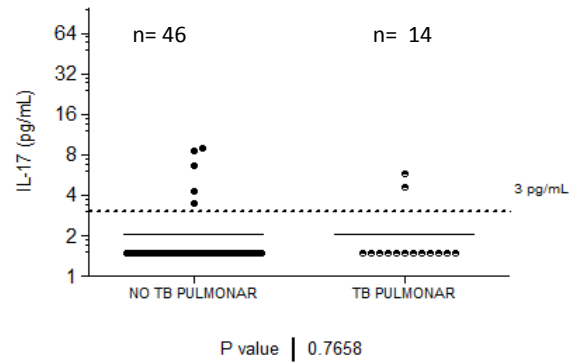
Fuente: Paula Losada y cols. Niveles de IL-17 en lavado broncoalveolar de pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar con baciloscopia negativa y su utilidad diagnóstica.

Figura 1. Reproducción de la curva estándar del Kit de ELISA para medición de IL-17 recombinante humana.



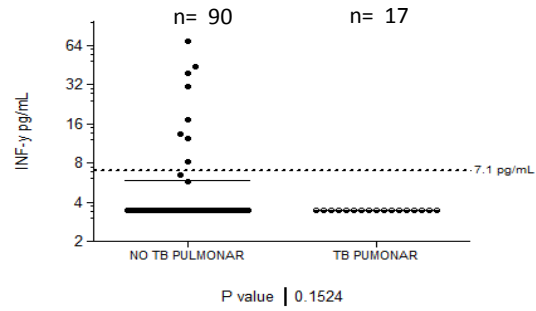
Fuente: Paula Losada y cols. Niveles de IL-17 en lavado broncoalveolar de pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar con baciloscopia negativa y su utilidad diagnóstica.

Figura 2. Niveles de IL-17 mediante ELISA.



Fuente: Paula Losada y cols. Niveles de IL-17 en lavado broncoalveolar de pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar con baciloscopia negativa y su utilidad diagnóstica.

Figura 3. Niveles de INF- γ mediante Citometría de flujo.



Fuente: Paula Losada y cols. Niveles de IL-17 en lavado broncoalveolar de pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar con baciloscopia negativa y su utilidad diagnóstica.