



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR
ZUBIRÁN**

**ASOCIACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE LA
PROTEÍNA “D” DEL FACTOR SURFACTANTE Y EL RIESGO DE
PROGRESIÓN A INSUFICIENCIA RESPIRATORIA AGUDA EN PACIENTES
CON NEUMONÍA POR EL VIRUS INFLUENZA A H1N1 2009.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

CARLOS ALBERTO DELGADO QUINTANA

TUTOR:

DR. FERNANDO EDGAR KRÖTZSCH GÓMEZ

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y
DE LA SALUD**

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

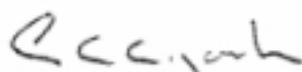
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACIÓN DE TESIS

Asociación entre las concentraciones séricas de la proteína "D" del factor surfactante y el riesgo de progresión a insuficiencia respiratoria aguda en pacientes con neumonía por el virus Influenza A H1N1 2009.



Dr. Carlos Alberto Aguilar-Salinas

Coordinador Académico de la sede. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán



Dr. Fernando Edgar Krötzsch Gómez

Tutor de Tesis. Instituto Nacional de Rehabilitación



Carlos Alberto Delgado Quintana

Tesista

ÍNDICE

Contenido	Página
Resumen	4
Abstract	5
Antecedentes generales	6
Antecedentes específicos	17
Planteamiento del problema	19
Justificación	19
Hipótesis	19
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
Diseño	22
Metodología	24
Análisis estadístico	26
Recursos	26
Consideraciones éticas	28
Resultados	29
Discusión	37
Conclusión	42
Referencias	43
Anexos	48

RESUMEN

ASOCIACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE LA PROTEÍNA “D” DEL FACTOR SURFACTANTE Y EL RIESGO DE PROGRESIÓN A INSUFICIENCIA RESPIRATORIA AGUDA EN PACIENTES CON NEUMONÍA POR EL VIRUS INFLUENZA A H1N1 2009.

INTRODUCCIÓN: El brote pandémico de Influenza A H1N1 de 2009 fue un problema de Salud Pública en México debido a la tasa de letalidad reportada (0.4%), que fue la más alta a nivel mundial. Estos virus de origen recombinante, alteran la respuesta antiviral típica del hospedero, lo cual se relaciona con el desarrollo de insuficiencia respiratoria y muerte. La proteína “D” del factor surfactante (SP-D) es una colectina que regula la homeostasis alveolar y posee afinidad por la hemaglutinina de los virus Influenza A, lo que permite su agregación y opsonización. En la investigación clínica se ha propuesto a SP-D como biomarcador de severidad en enfermedades pulmonares.

OBJETIVO: Establecer la asociación entre las concentraciones séricas de SP-D y el riesgo de progresión a insuficiencia respiratoria aguda en pacientes con neumonía por Influenza A H1N1 2009.

MÉTODOS: Cohorte prospectiva que incluyó a 37 pacientes con neumonía por Influenza A H1N1 2009. Se determinó SP-D en suero por el método de ELISA al ingreso del estudio. Las concentraciones séricas de SP-D fueron analizadas estadísticamente para asociarlas con desenlaces clínicos como insuficiencia respiratoria y mortalidad a 28 días. Se efectuaron análisis de riesgo relativo, curvas ROC y estimadores de sobrevida para diferentes concentraciones séricas de SP-D.

RESULTADOS: Se presentó insuficiencia respiratoria aguda en 89.19% y mortalidad en 32.42% de los sujetos de la cohorte. Las concentraciones de SP-D en suero fueron mayores en los fallecidos a 28 días respecto a los sobrevivientes ($p < 0.02$). El análisis de curva ROC para SP-D como predictor de mortalidad a 28 días mostró un área bajo la curva de 0.73 (IC_{95%} 0.56 – 0.86). La fuerza de asociación entre mortalidad y SP-D en suero obtuvo un RR de 6.69 (IC_{95%} 1.5338 – 29.2281, $p < 0.013$) para valores séricos >250 ng/mL. El análisis de Kaplan y Meier demostró diferencia significativa en los estimadores de sobrevida para valores de SP-D en suero <250 ng/mL (S_{K-M} 0.91, IC_{95%} 0.51 - 0.98) y ≥ 250 ng/ml (S_{K-M} 0.38, IC_{95%} 0.16-0.61, Log rank $p < 0.021$). SP-D no se asoció significativamente con el desarrollo insuficiencia respiratoria.

CONCLUSIÓN: El presente estudio sugiere que en la neumonía por el virus influenza A H1N1 2009 las concentraciones séricas de SP-D se asocian de forma directa con la mortalidad a 28 días. Esta proteína es un potencial biomarcador del pronóstico en esta infección. Se requiere la validación de los resultados en estudios con mayor tamaño muestral y determinaciones seriadas.

ABSTRACT

ASSOCIATION BETWEEN SERUM SURFACTANT PROTEIN D AND THE RISK OF PROGRESSION TO ACUTE RESPIRATORY FAILURE IN PATIENTS WITH PNEUMONIA SECONDARY TO A H1N1 2009 INFLUENZA VIRUS.

BACKGROUND: A H1N1 2009 Influenza pandemics implicated a public health issue in Mexico due to the observed lethality rate (0.4%) which was the highest worldwide. This recombinant-origin viruses modify host typical antiviral immune response, this fact is related with the development of respiratory failure and death. Surfactant protein “D” (SP-D) is a collectin that acts as a regulator of alveolar homeostasis and possess affinity to A Influenza viruses’ haemagglutinin, allowing viral aggregation and opsonization. SP-D has been proposed as a biomarker of lung diseases in clinical research.

OBJECTIVE: To establish association between serum SP-D concentrations and the risk of progression to acute respiratory failure in patients with pneumonia due to the A H1N1 2009 influenza virus.

METHODS: Prospective cohort of 37 patients with A H1N1 Influenza pneumonia. Serum SP-D was measured with the ELISA method at study entry. Serum SP-D values were statistically analyzed in order to be associated with clinical endpoints such as respiratory failure and 28-day mortality. We performed relative risk calculation, ROC curves and survival estimates for different SP-D values.

RESULTS: Respiratory failure developed in 89.19% of the cohort and the 28-day mortality was 32.42%. Serum SP-D values were higher in those who died in comparison to survivors ($p < 0.02$). ROC curve analysis of SP-D as a 28-mortality predictor showed an AUC of 0.73 (CI_{95%} 0.56 – 0.86). Relative risk of death given a serum SP-D value >250 ng/mL was 6.69 (CI_{95%} 1.5338 – 29.2281, $p < 0.013$). Kaplan-Meier’s survival analysis showed statistical significance on the survival estimates given SP-D values <250 ng/mL (S_{K-M} 0.91, CI_{95%} 0.51 - 0.98) and ≥ 250 ng/ml (S_{K-M} 0.38, CI_{95%} 0.16-0.61, Log rank $p < 0.021$). SP-D did not showed association with the respiratory failure endpoint.

CONCLUSION: Our results suggest that serum SP-D is directly associated with the 28-day mortality risk in patients with pneumonia due to the A H1N1 2009 Influenza virus. The protein is proposed as a potential prognostic biomarker in this infection. Validation of these observations in future studies with greater sample sizes and serial SP-D measurements is required.

ANTECEDENTES GENERALES

PANDEMIA POR INFLUENZA A H1N1 2009

Los virus clásicos de influenza A H1N1 son producto de una triple recombinación entre segmentos genómicos de cepas infectantes en humanos, cepas porcinas y el virus aviar norteamericano. Cada año ocurren 500 millones de infecciones por estos virus a nivel mundial y ocasionan de 250,000 a 500,000 muertes/año⁽¹⁻³⁾.

La pandemia por Influenza A H1N1 de 2009 es un evento sin precedente en la virología moderna debido a la emergencia de una cepa patógena transmisible entre humanos que conservó la infectividad a porcinos. Estos virus se originaron del rearrreglo de 6 segmentos genómicos del virus A H1N1 norteamericano “triple recombinante” con 2 segmentos de una cepa H1N1 eurasiática infectante en cerdos⁽⁴⁻⁷⁾.

Algunos sectores de la población presentaron inmunidad parcial ante esta infección debido a la presencia de virus A H1N1 en America del norte desde 1977. Las personas nacidas antes de 1956 experimentaron infección por otros subtipos de Influenza A, entre ellos H1N1, por ello, esta cepa viral no fue considerada un nuevo subtipo^(3-5,8).

El caso índice en México se reportó el 10 de marzo de 2009 en la localidad de La Gloria, Veracruz. Los *Control Disease Centers* (CDC) de EE.UU. identificaron un virus A H1N1 en dos especímenes independientes del sur de California y en otros dos de origen mexicano a finales del citado mes. Las semanas siguientes, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica registró incremento en los casos de enfermedad respiratoria aguda en los estados de México, San Luis Potosí, Oaxaca y el Distrito Federal. El total de casos confirmados fue 24,686 con 215 defunciones para septiembre de 2009. La mayoría de los casos se presentaron con sintomatología respiratoria leve, fiebre y diarrea⁽⁸⁾.

La mayor proporción de defunciones por neumonía grave con síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (SIRA) y falla orgánica múltiple se observó en México con una tasa de letalidad de 0.4%. El 65% de los fallecimientos ocurrió en el grupo de 20 a 49 años, en estos, se asociaron frecuentemente antecedentes como *Diabetes mellitus* (34.1%), tabaquismo (22.3%), enfermedades cardiovasculares (15.6%) y padecimientos respiratorios crónicos (11.2%)^(8,9).

Características clínicas

Al igual que la influenza estacional, la cepa H1N1 2009 es transmisible por 3 vías: exposición por contacto (mano - membranas faciales), exposición de gotas en aerosol y exposición aérea (inhalación de partículas). Las áreas de baja temperatura y humedad son condiciones ambientales que favorecen la transmisión en aerosol, explicando su naturaleza estacional⁽⁴⁻⁶⁾.

El período de incubación es de 1 a 7 días, la propagación viral inicia un día previo a los síntomas y se ha demostrado que puede continuar por 5, 7 y 10 días posteriores a la resolución clínica en 50, 40 y 10% de los casos, respectivamente⁽⁵⁾.

Los síntomas principales de esta infección son: fiebre (96%), cefalea (82%), odinofagia (82%), rinorrea (82%), escalofrío (80%), mialgias (80%), náusea (55%), diarrea (48%), disnea (48%), artralgias (46%) y dolor abdominal (36%). Las infecciones no complicadas por Influenza A H1N1 causan traqueobronquitis transitoria dada por la unión viral a las células epiteliales traqueales y bronquiales^(5,8,9).

Las condiciones médicas subyacentes como asma, enfermedades pulmonares crónicas, *Diabetes mellitus*, obesidad mórbida, autoinmunidad, terapia inmunosupresora, padecimientos neurológicos, cardiovasculares o el embarazo son predictoras de hospitalización⁽⁹⁾.

Las complicaciones son más frecuentes en los menores de 5 y mayores de 65 años, embarazadas y portadores de enfermedades pulmonares crónicas, principalmente asma. La principal complicación respiratoria es la extensión de la infección viral a los alvéolos, frecuentemente acompañada de sobreinfección bacteriana y neumonía grave principalmente por *Streptococcus* de las especies *pneumoniae*, *pyogenes* y *mitis*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae*. Otras complicaciones no respiratorias reportadas son: encefalopatía, miocarditis y miopatía^(1,3,5,8,9).

Un caso confirmado de Influenza A H1N1 se establece con un resultado positivo de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR) ó por un cultivo viral positivo^(4,10).

Virología

Los virus Influenza A pertenecen a la familia *Orthomixoviridae*, son pleomórficos, miden 80 a 120 nm de diámetro y 200 a 300 nm de longitud. Se componen de nucleocápside, proteína de matriz, nucleoproteína y un complejo de RNA polimerasa. La cápside viral se forma por una bicapa lipídica y en ella se insertan las proteínas hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) y M2 formando proyecciones que miden de 10 a 14 nm⁽⁴⁻⁶⁾.

El genoma viral consta de 8 segmentos de RNA monocatenario de sentido negativo, con longitud de 13,600 nucleótidos. Cada segmento de este genoma multipartita se encuentra en una cápside y en conjunto se rodean por la envoltura. Se ha documentado la presencia de copias de RNA de interferencia adicionales a los segmentos genómicos cuyo significado biológico actualmente no es claro. El genoma codifica para proteínas estructurales y no estructurales, referidas a continuación⁽⁴⁻⁷⁾:

- *Hemagglutinina (HA): facilita la unión del virus a las células del epitelio respiratorio y la fusión endosómica.*
- *Subunidades de la RNA polimerasa: PB1 (básica) y PB2 (ácida).*
- *Nucleoproteínas: llevan a cabo la replicación y transcripción del RNA viral.*
- *Proteína transportadora nuclear y proteína de matriz: exportan los complejos de ribonucleoproteína del núcleo al citoplasma para el ensamblado de los viriones en la membrana plasmática.*
- *Neuraminidasa (NA): Facilita la liberación viral de las células del hospedero.*

Todos los segmentos codifican para una proteína, excepto el gen PB1 que codifica también a PB1-F2 en algunas cepas virales. Cada gen tiene secuencias repetitivas terminales no traducibles en sus extremos 5' y 3', estas constituyen señales de replicación y encapsidación. Los últimos trece nucleótidos del extremo 5' y los doce finales en el 3' son altamente conservados en todos los genes virales^(4,6,7).

Los virus Influenza A infectan una gran variedad de organismos vertebrados. Son clasificados de acuerdo a la expresión de uno de sus dieciséis subtipos de HA en combinación con una de las nueve variantes de NA conocidas hasta el momento^(4,5).

El paso inicial de la infección viral está dado por la unión de HA con el ácido N-acetilneuramínico ó siálico (SA), monosacárido de nueve carbonos que posee carga negativa y se localiza en la membrana plasmática de las células del epitelio respiratorio. El SA favorece la captación celular de agua mediante atracción de las cargas positivas del hidrógeno. Generalmente, forma glucoconjugados con galactosa a través de enlaces denominados α -2,3 ó α -2,6. El epitelio respiratorio humano presenta SA con enlaces α -2,6 mientras que la configuración α -2,3 se encuentra en otras especies de vertebrados. Esta diferencia constituye el principal determinante del tropismo viral pues el sitio de reconocimiento de HA confiere la capacidad de infectar a diversas especies, por

ejemplo, los análisis de secuencias de aminoácidos indican que la presencia de glutamina y glicina en los sitios 226 y 228 de los subtipos H2 y H3 permiten el reconocimiento del enlace α -2,3 del SA aviario, en cambio, serina y leucina en estas posiciones confieren al virus la capacidad de unión a los SA α -2,6 del epitelio humano. En el subtipo H1, los residuos de ácido glutámico (190) y glicina (225) son responsables de la interacción con los SA humanos^(2,4-6,11).

La HA está ampliamente ligada a la virulencia e implantación, además, es el principal blanco de anticuerpos neutralizantes. Es un trímero en forma de bastón, que posee un dominio transmembranal y una cabeza globular formada por 3 dominios idénticos que forman una proyección espigada que emerge de la superficie viral. La cabeza globular tiene al menos cinco sitios antigénicos que rodean el sitio de unión a receptor. Los subtipos altamente virulentos, como H5 y H7 poseen una HA con múltiples aminoácidos básicos en su sitio de unión, éstos son reconocidos por proteasas de distintos tejidos, lo cual resulta en la diseminación sistémica del virus. Por el contrario, los subtipos de baja patogenicidad sólo poseen un residuo de arginina en esta localización y usualmente se unen a proteasas tejido-específicas como la triptasa de las células Clara, resultando en infecciones localizadas y leves^(1,2,4,5,7).

La NA, también llamada sialidasa, cataliza la hidrólisis de los enlaces terminales del SA con la mucina y las células del hospedero. Participa en la liberación viral removiendo las moléculas de SA de los viriones y rodea la superficie celular para evitar la agregación de otros virus^(1,4,6).

La partícula viral es internalizada vía endocitosis clásica mediada por receptor, en vesículas cubiertas de clatrina. La proteína M2 actúa como un canal de protones que permite la acidificación del interior de la partícula viral. El pH bajo de los endosomas,

provoca un cambio conformacional en HA favoreciendo la fusión de las membranas viral y celular permitiendo la liberación viral al citoplasma y la disociación de los complejos de ribonucleoproteínas que serán transportados hacia el núcleo^(1,2).

La replicación y transcripción del RNA viral es llevada a cabo por el complejo de la RNA polimerasa, los mRNA virales son exportados hacia el citoplasma por las proteínas NEP y M1 para iniciar su traducción. Finalmente, la progenie viral es ensamblada y emerge de la membrana plasmática, previamente modificada por HA, NA y M2⁽¹⁾.

Determinantes de patogenicidad.

Las proteínas virales mejor caracterizadas dado su potencial patógeno son HA, PB1, PB2 y NS1. Por otra parte, NA y M2 se asocian con el desarrollo de resistencia a los fármacos antivirales⁽⁵⁾.

Las mutaciones en el gen PB1, principalmente Lys13Pro y Ser678Asn se asocian con incremento de la replicación viral y mayor virulencia en modelos de experimentación^(1,2,5).

La proteína PB1-F2 (87-89 aa.) es codificada en una secuencia alternativa del gen de la polimerasa (PB1) en algunas cepas de Influenza A. Contribuye con la patogenicidad induciendo la apoptosis pues interactúa con proteínas de la membrana mitocondrial promoviendo la liberación del citocromo c. Exacerba la respuesta inflamatoria incrementando la frecuencia y severidad de las sobreinfecciones bacterianas. Este fenómeno se ha observado en el subtipo H5N1 y actualmente su mecanismo es desconocido. Los virus A H1N1 2009 codifican un péptido PB1-F2 de once aminoácidos que hasta el momento se asocia con incremento en la patogenicidad^(1,2,5-7,12).

El gen PB2 se ha asociado con diversas mutaciones que incrementan la transmisibilidad y diversidad de hospederos. Por ejemplo, la sustitución Glu627Lys es considerada un determinante universal de patogenicidad pues confiere al subtipo H5N1 (aviario) la infectividad al humano, la cepa H1N1 2009 presenta esta modificación en su genoma^(1,4,6,7).

La proteína NS1 o proteína “no estructural” no forma parte de la partícula viral, sin embargo, presenta un elevado nivel de expresión en las células infectadas. Es dimérica, se acumula en el núcleo y posee la capacidad de unirse al RNA de doble cadena (dsRNA). Antagoniza la respuesta celular de interferón- β (IFN- β), bloqueando la activación de PKR (proteína cinasa dependiente de dsRNA), también interfiere con los factores de transcripción y genes estimulados por IFN- β . Se implica a diversas mutaciones de NS1 con la virulencia y patogenicidad, dado que le confieren la capacidad de alterar la respuesta inmune. Por ejemplo, la mutación Asn92Glu se asocia con mayor patogenicidad en cepas aviarias^(1,4,5,7).

Respuesta inmune al virus Influenza A H1N1

Una vez que la célula es infectada, inicia la respuesta inmune por los linfocitos T cooperadores (Th) ante los péptidos derivados de los antígenos virales presentados al receptor de células T. En general, se describen dos patrones de respuesta, el perfil Th1 con producción de interferón- γ (INF- γ), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interleucina 2 (IL-2) y el perfil Th2 que se caracteriza por la síntesis de interleucinas 4, 5, 6, 9, 10. Estudios en macrófagos humanos demuestran que H1N1 2009 es un débil inductor temprano de citocinas mientras que en etapas tardías se asocia con una fuerte expresión de IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10, lo cual sugiere que el virus altera la regulación típica de la respuesta inmune^(4,5,13).

Mukherjee y cols. realizaron un estudio para identificar diferencias la expresión génica de las células epiteliales pulmonares en las infecciones por Influenza A H1N1 2009 y A H1N1 estacional. Se analizaron cuatro momentos de la infección (4, 8, 16, 24 horas post-infección). Los genes relacionados con activación y proliferación de células T y los de señalización enzimática ligada a proteínas mostraron incremento en su expresión durante todo el estudio. La infección por H1N1 2009 indujo una importante disminución en la expresión de interleucinas, TNF- α , proteína de choque térmico, genes reguladores de apoptosis y señalización mediada por el factor nuclear kappa-B (Nf- κ B). Las células infectadas por H1N1 estacional presentaron activación temprana del gen de caspasa 3, indicando respuesta apoptótica temprana del hospedero, en cambio, en la infección por H1N1 2009 se encontró mayor expresión de este gen en etapas tardías, sugiriendo una habilidad selectiva para inducir apoptosis⁽¹⁴⁾.

Potencial pandémico de la Influenza A

Los virus Influenza A son responsables de epidemias recurrentes y pandemias que ocurren cuando una proteína aviar (HA ó NA) y el gen PB1 se recombinan con el genoma de un virus de influenza humana ó cuando un virus aviar adquiere infectividad eficiente en humanos. Esto deriva en la generación de cepas virales con nuevos determinantes antigénicos ante los cuales no existe respuesta inmunológica⁽²⁾.

La constante evolución genómica de los virus Influenza A está dada por diversos mecanismos, como:

a) *Ausencia de comprobación de la actividad de la RNA polimerasa viral*: es considerado el más importante pues resulta en un elevado nivel de mutaciones puntuales (variación antigénica ó *antigenic drift*)⁽²⁾.

La tasa de mutaciones durante la replicación del genoma del virus influenza A H1N1 es aproximadamente de 1 cambio nucleotídico por cada copia del genoma (7.3×10^{-5} mutaciones/nucleótido replicado). Los segmentos genómicos virales que codifican a las proteínas objetivo de los anticuerpos neutralizantes (HA y NA) poseen tasas de mutación más elevadas lo cual se considera una respuesta adaptativa ante la presión selectiva del hospedero^(4,6).

La frecuencia de mutaciones en el genoma viral durante un año es <1% y toma de 2 a 5 años el alcanzar diferencias que puedan ser detectadas en pruebas serológicas como la aglutinación. Esta permanente variación antigénica es la causa de la revisión periódica de los virus que serán incluidos en la vacunación contra influenza⁽⁶⁾.

b) Naturaleza segmentada del genoma viral: nuevas progenies virales son formadas al existir recombinación de segmentos genómicos cuando dos o más cepas (aviar y humana) infectan a la misma célula (cambio antigénico ó *antigenic shift*). Se ha propuesto a los cerdos como los hospederos intermedios donde ocurre este proceso debido a que expresan los dos tipos de enlaces de SA (α -2,6 y α -2,3) en su epitelio respiratorio⁽⁴⁻⁷⁾.

c) Recombinación por cambio de “plantillas” genómicas: involucra la combinación de material genético de más de un origen (p. ej. RNA ribosomal con RNA viral o 2 segmentos de RNA de diferentes cepas). Estas modificaciones se asocian con cambios en la patogenicidad⁽⁷⁾.

En general, cualquier brote epidémico que involucre a un serotipo de HA no conocido por la especie humana en el siglo XX tiene altas probabilidades de ser muy severo. Los serotipos de HA como H1, H2 y H3 son involucrados frecuentemente en la influenza

pandémica, sin embargo, existe presencia ocasional de virus aviares que expresan los tipos H5, H7 ó H9^(1,4).

La pandemia de Influenza española de 1918-1919 cobró la vida de más de 50,000,000 de personas alrededor del mundo y se ha relacionado con un virus aviar A H1N1 que contenía en su genoma diversas secuencias codificantes propias de cepas infectantes en la especie humana. Otros eventos pandémicos por estos virus han ocurrido en 1957, 1976 y 1977 en EE.UU., China, Hong Kong y la antigua Unión Soviética^(1,2,4,5).

PROTEÍNA – D DEL FACTOR SURFACTANTE (SP-D)

Generalidades

La proteína D del factor surfactante (SP-D) es una colectina, codificada en el cromosoma 10 humano. Es sintetizada por los neumocitos tipo II y las células no ciliadas del epitelio bronquial (células de Clara). Se agrupa en trímeros, dodecámeros y multímeros, posee un extremo amino-terminal similar a la colágena y el extremo carboxilo-terminal ó “dominio receptor de colectina” tiene función de reconocimiento antigénico. Se encuentra soluble en el fluido alveolar y es independiente del factor suerfactante⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

La determinación de SP-D en humanos puede realizarse en suero, líquido de aspirado traqueal, lavado bronco-alveolar (LBA) y líquido amniótico a partir de la semana 30 de gestación^(15,16).

Estudios con sujetos sanos reportan que el rango percentilar 25-75 de concentración en suero fue de 60-90 ng/ml, sin embargo, no existe un estandar internacional de normalidad⁽¹⁸⁾.

Funciones

Los modelos experimentales sustentan que esta proteína regula la homeostasis pulmonar al demostrar en ratones nulos para el gen de SP-D (*Spd*^{-/-}) la presencia de infiltrado peribronquial y perivascular por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, expresión de marcadores de activación (CD69 y CD25), incremento en la liberación de metaloproteinasas de matriz por los macrófagos (MMP2, MMP9, MMP12), desordenamiento de los depósitos lipídicos del surfactante, proteinosis y destrucción alveolar^(15-17,19-24).

Se considera a SP-D como un elemento de la inmunidad innata por su capacidad de aglutinar, opsonizar y neutralizar patógenos gracias a la afinidad de su dominio carboxilo-terminal por oligosacáridos microbianos como maltosa, glucosa y manosa^(15,16,20,21,25,26).

SP-D interactúa con patógenos como: virus influenza A, virus sincicial respiratorio, adenovirus, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cándida sp.*, *Aspergillus fumigatus*, y *Criptococcus sp.*^(15-17, 19,20,25).

Al encontrarse unida a ligandos microbianos, SP-D promueve el inicio de la respuesta inflamatoria mediante modificaciones de su estructura cuaternaria originadas por nitrosilación de cisteína en las posiciones 15 y 20 del dominio carboxilo-terminal, impidiendo la agrupación de trímeros en dodecámeros^(22,23).

Los trímeros de SP-D estimulan a los neutrófilos, macrófagos y células dendríticas alveolares mediante su interacción con el receptor CD91 conocido como LRP1 (*lipoprotein receptor related 1*) que activa a la cinasa p38 MAPK (*mitogen activated protein kinase*) para la fosforilación de proteínas e inicio de la transcripción del DNA.

Estos eventos derivan en proliferación celular, mayor captación antigénica y actividad fagocítica así como depuración de células apoptóticas^(21,26-28).

SP-D en la investigación clínica.

La proteína SP-D es un biomarcador de severidad ó exacerbación en enfermedades pulmonares y procesos sistémicos con repercusión pulmonar. Dada su naturaleza hidrosoluble, los incrementos en las concentraciones séricas de esta proteína reflejan incremento de la permeabilidad alveolo-capilar por daño al epitelio alveolar^(15,17).

Se han reportado concentraciones séricas elevadas de SP-D en la fibrosis quística, neumonías intersticiales, asma, proteinosis alveolar y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. En un grupo de pacientes con Lupus eritematoso sistémico se observaron concentraciones séricas disminuídas^(15,16,18,29,30).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Interacción SP-D con los virus Influenza A

SP-D actúa como un beta-inhibidor clásico mediante la unión de su dominio receptor de colectina con los oligosacáridos ricos en manosa presentes en el sitio de unión de la HA viral. La neutralización de las cepas virales *in vitro* correlaciona con la virulencia *in vivo*⁽²³⁾.

Para que esta unión sea eficiente se requiere la glicosilación de la HA en su residuo Asn165 del dominio HA1, lo que sugiere que los cambios en los aminoácidos cercanos

al sitio de unión con SA son importantes marcadores de variación antigénica que modifica la actividad neutralizante de SP-D^(22,23).

La afinidad de SP-D por la HA glicosilada es alta y se ha demostrado en análisis de LBA que esta colectina es la responsable mayoritaria de la neutralización viral en humanos⁽²³⁾.

La recuperación de la infección por virus de influenza A depende una adecuada respuesta inmune celular, sin embargo, los mediadores locales de la inmunidad innata son importantes para limitar el crecimiento y diseminación viral en etapas tempranas. En los pacientes con inmunopatologías o inmunosupresión estos mecanismos poseen aún mayor relevancia⁽²²⁻²⁴⁾.

En resumen, la infección por los virus Influenza A H1N1 2009 constituyó un problema de Salud Pública debido a su virulencia, transmisibilidad humano-humano y la morbilidad y mortalidad observadas en grupos especiales de riesgo. Aparentemente, la respuesta inmune celular antiviral típica se encuentra alterada en la infección debido a la variación antigénica de esta cepa, en este caso, la respuesta neutralizante de los mecanismos de inmunidad innata parece tener importancia en el control temprano de la infección. Las colectinas, podrían desempeñar un papel central en la respuesta inicial ante estos agentes. SP-D es una colectina que ha sido considerada biomarcador en algunos padecimientos pulmonares agudos y crónicos. Dada su especificidad tisular y microbiológica se le propone como un indicador de la severidad y pronóstico en un grupo de pacientes infectados por el virus pandémico A H1N1 2009.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la pandemia de 2009 por Influenza A H1N1 se observó incremento en la mortalidad por insuficiencia respiratoria en grupos particulares de riesgo debido a la capacidad del virus de alterar la respuesta inmune celular. La proteína SP-D es un elemento de la inmunidad innata que neutraliza a los virus Influenza A y ha sido postulada como un biomarcador en enfermedades pulmonares. Se desconoce la asociación de SP-D con la evolución y severidad del daño pulmonar en esta infección. Formulamos la siguiente pregunta de investigación:

¿Existe asociación entre las concentraciones séricas de SP-D y el riesgo de progresión a insuficiencia respiratoria aguda en los pacientes con neumonía por Influenza A H1N1 2009?

JUSTIFICACIÓN

Investigamos la asociación de SP-D con eventos clínicos en la Influenza A H1N1 2009 para establecer a esta proteína como biomarcador de la enfermedad. Esto permitirá identificar a los casos de alto riesgo para anticipar en ellos la terapéutica respiratoria. Los resultados de esta investigación podrían ayudar a formular hipótesis de trabajos futuros sobre la utilidad clínica de esta colectina en otras enfermedades pulmonares.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las concentraciones séricas de SP-D presentan asociación directa con el riesgo de progresión a insuficiencia respiratoria aguda en pacientes con neumonía por Influenza A H1N1 2009

OBJETIVO GENERAL

Establecer la asociación entre las concentraciones séricas de SP-D y el riesgo de progresión a insuficiencia respiratoria aguda en pacientes con neumonía por Influenza A H1N1 2009

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir las características demográficas y epidemiológicas de la población de estudio.
- Determinar las concentraciones séricas de SP-D en un grupo de pacientes con neumonía por el virus H1N1 2009.
- Analizar la distribución estadística de las concentraciones séricas de SP-D en los pacientes con neumonía por Influenza A H1N1
- Comparar las concentraciones séricas de los casos de neumonía con un grupo de controles intradomiciliarios sanos no emparentados.
- Correlacionar las concentraciones séricas de SP-D de los casos de neumonía con variables fisiológicas respiratorias y los puntajes de escalas de severidad para pacientes en estado crítico.
- Comparar las concentraciones séricas de SP-D de los casos con neumonía que desarrollaron insuficiencia respiratoria con aquellos que no la desarrollaron.
- Comparar las concentraciones séricas de SP-D entre sobrevivientes y fallecidos a 28 días.

- Construir una curva ROC para las concentraciones séricas de SP-D como predictor de mortalidad a 28 días en pacientes con neumonía por influenza A H1N1.
- Calcular el riesgo relativo de insuficiencia respiratoria y mortalidad en función de las concentraciones séricas SP-D.
- Integrar la función de supervivencia de Kaplan y Meier en relación a las concentraciones séricas de SP-D en pacientes con neumonía por influenza A H1N1.

DISEÑO

Se estudió a una cohorte de pacientes con neumonía por influenza A H1N1 2009 para establecer la asociación entre eventos como la insuficiencia respiratoria y mortalidad a 28 días con las concentraciones séricas de SP-D.

Características del estudio

Propósito: Descriptivo

Selección de los sujetos: Consecutiva

Asignación de la maniobra: Observacional

Seguimiento: Si

Dirección del seguimiento: Prospectivo

Población de estudio

Pacientes con diagnóstico de infección por el virus Influenza A H1N1 2009 atendidos en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Criterios de selección

Inclusión

- Hombres ó mujeres
- Edad mayor de 18 años
- Casos de Neumonía por virus de la influenza A H1N1 definido por:
 - Infiltrados pulmonares agudos, evidenciados por telerradiografía de tórax.
 - Confirmación virológica de A H1N1 por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos iniciadores sugeridos por la OMS.

Exclusión

- Enfermedad pulmonar crónica
 - EPOC, asma, fibrosis pulmonar, síndrome de hipoventilación alveolar, fibrosis quística, enfermedad autoinmune con diagnóstico confirmatorio de vasculitis pulmonar
- Embarazo
- Enfermedad neoplásica
- Lupus eritematoso sistémico
- Inmunosupresión
- Inmunodeficiencia
- Hospitalización por padecimiento respiratorio en los 90 días previos al ingreso al estudio.

Eliminación:

- Seguimiento incompleto
- Extravío de muestras serológicas
- Retiro del consentimiento

Tamaño muestral

Muestra obtenida del grupo de pacientes del INER, compuesta por 37 casos consecutivos de neumonía por Influenza A H1N1 2009 confirmados con RT-PCR.

METODOLOGÍA

Estudio de cohorte de pacientes con neumonía por Influenza A H1N1 2009 realizado en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de enero a diciembre de 2010.

Reclutamiento

Se identificó en el registro de ingresos a Urgencias del INER a los casos con diagnóstico probable de neumonía por Influenza A H1N1, al seleccionarlos se obtuvo su consentimiento informado para participar en la investigación.

Seguimiento clínico

El expediente clínico fue la fuente primaria de información. Se obtuvieron variables demográficas, antropométricas, antecedentes personales, evolución clínica y resultados de auxiliares diagnósticos. Se registró la incidencia de insuficiencia respiratoria, intubación orotraqueal, inicio de ventilación mecánica, requerimiento de vasopresores, extubación, ingreso y egreso a cuidados intensivos y defunción. El período de seguimiento se estableció en 28 días a partir del ingreso. Los datos fueron consignados en el formato de recolección (Anexo 1).

Obtención y procesamiento de muestras sanguíneas

Se extrajeron 10 ml de sangre de cada paciente mediante punción de la vena cefálica, depositándolos en un tubo con gel para separación de suero y asignando un número de control a cada caso. Las muestras se enviaron en un lapso de tiempo no mayor a 30 minutos al laboratorio de Genética e Inmunobiología del INER donde se obtuvo el suero por centrifugación. Posteriormente, el suero se almacenó en viales de 1 ml y se mantuvo en criopreservación a -70 °C para la posterior determinación de SP-D.

Una vez almacenadas, sólo se incluyeron en el estudio las muestras de los pacientes con diagnóstico confirmado de Influenza A H1N1 por RT-PCR positiva.

Determinación de SP-D en suero

Se efectuó mediante la técnica de ELISA, utilizando el kit *Human Surfactant Protein D (SP-D) ELISA* de BioVendor Research and Diagnostic Products (Cat. No.: RD194059100R. Área bajo la curva 0.80, variación inter-ensayo: 7.5%, variación intra-ensayo: 4.7%, límite analítico: 0.2 ng/ml.)

En los pozos cubiertos de anticuerpo anti-SP-D, se pipetearon 100 µL de las soluciones calibradoras en concentraciones de 1.56 hasta 100 ng/ml y los estándares de calidad correspondientes a SP-D por duplicado para construir la curva estándar (Inmunorreacción - logaritmo de concentración en 4 puntos).

Se diluyeron las muestras de suero con solución amortiguadora en razón 1:11, para pipetear 100 µL de éstas en cada pozo por duplicado. El set completo se incubó por 24 horas a temperatura de 6 °C.

Al término de la incubación, se pipetearon 100 µL de solución de lavado en cada pozo por 3 ocasiones. Se agregaron 100 µL de solución conjugada en cada pozo, incubando a temperatura ambiente durante dos horas, con agitación orbital a 300 rpm. Al término de este período, la placa se lavó tres veces más y se agregaron 100 µL de sustrato para incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos, finalmente, se adicionaron 100 µL de solución de paro en cada pozo.

La lectura de la absorción se efectuó en los 5 minutos posteriores al término de la reacción, mediante espectrofotometría con filtro para longitud de onda de 450 ± 10 nm. Los datos obtenidos se contrastaron con la curva estándar para la intrapolación de las concentraciones de SP-D en las muestras de suero.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La base de datos se integró en el software Excel 2008 para Mac OS. El análisis se efectuó con el programa Stata 10.0 para Mac OS.

Las variables continuas se exploraron mediante análisis de curtosis, sesgo y prueba de Kolmogorov-Smirnov para identificar su distribución y elegir las medidas de tendencia central y dispersión adecuadas.

La comparación entre grupos para medias se realizó con t de Student y la de medianas con U de Mann-Whitney. Se calcularon riesgos relativos con tabla de 2 x 2 y la función *Hazard ratio* mediante regresión de Cox. Se efectuó análisis de curva receptor-operador, sensibilidad y especificidad. Los valores predictivos se calcularon con el teorema de Bayes. Las funciones de supervivencia y falla, así como sus curvas correspondientes se construyeron con el método de Kaplan y Meier y regresión de Cox.

RECURSOS

Humanos

Investigador

Tutor

Co-tutor

Personal del laboratorio de Inmunobiología y Genética

Materiales

Expedientes clínicos

Formato de recolección de datos

Formato de consentimiento informado

Material de curación

Jeringas 10 ml

Tubos para separación de suero y viales de transporte.

Pipetas de precisión y multipipetas.

Ultracongelador

Laboratorio de Inmunobiología y Genética

Kit Human Surfactant Protein D (SP-D) ELISA de BioVendor Research and Diagnostic Products (Cat. No.: RD194059100R)

Equipo de cómputo

Económicos

Presupuesto del Laboratorio de Inmunobiología y Genética, INER.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se obtuvo el consentimiento informado para la obtención de sangre venosa periférica y determinación de SP-D en todos los participantes en la investigación (Anexo 2).

El protocolo fue sometido a revisión y aceptado por el Comité de Bioética e Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

RESULTADOS

Características clínicas y epidemiológicas de la población

El protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética e Investigación del INER el 27 de mayo de 2010. Se incluyeron 37 pacientes de la cohorte de pacientes del INER con diagnóstico de neumonía por Influenza A H1N1 2009 mediante consentimiento informado. Todos los casos fueron confirmados para el diagnóstico de Influenza A H1N1 con RT-PCR según las especificaciones de la OMS. No se presentaron pérdidas de seguimiento.

La población de estudio se compuso en 62% por hombres (23/37). La media muestral para edad fue 39.51 ± 12.59 años y la superficie corporal 1.92 ± 0.21 m². El 57% (21/37) de los pacientes refirió el antecedente de tabaquismo.

Todos los pacientes fueron tratados con Oseltamivir 75 mg por vía oral o enteral cada 12 horas a partir de su ingreso a Urgencias del INER. El resto del tratamiento médico como antimicrobianos, soporte vital cardiovascular y modalidad de asistencia ventilatoria mecánica fue prescrito de forma individualizada por los médicos del INER.

El tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas generales (cefalea, fiebre y ataque al estado general) y el ingreso a hospitalización fue de 7 días (IQR₂₅₋₇₅ 2 – 21 días). El intervalo transcurrido desde la aparición de disnea hasta el egreso por mejoría ó defunción fue de 16 días (IQR₂₅₋₇₅ 1 – 38 días).

Respecto a las condiciones de ingreso de la población, presentaron temperatura corporal de 37.15 ± 0.8 °C, frecuencia cardíaca de 102 ± 18 latidos por minuto y tensión arterial media de 81.10 ± 15.23 mmHg. La media para saturación por oximetría de pulso fue $75.16 \pm 10.1\%$, el análisis de gases en sangre arterial permitió calcular un índice

PaO₂/FiO₂ de 190 (IQR₂₅₋₇₅ 161 - 248). El puntaje APACHE II al ingreso fue de 10 ± 4 puntos.

Todos los pacientes fueron hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos del INER con mediana de estancia de 13 días (IQR₂₅₋₇₅ 8-20 días). El 89.19% (33/37) de la población desarrolló insuficiencia respiratoria aguda, ameritando intubación orotraqueal y apoyo ventilatorio mecánico. Se presentaron 12 defunciones, correspondientes al 32.43% de los casos, la mediana de tiempo a la defunción fue de 11 días (IQR₂₅₋₇₅ 8 – 17 días) a partir del ingreso.

Las características clínicas y demográficas de las subpoblaciones de supervivientes y fallecidos fueron comparadas mediante las pruebas *t* de student y U de Mann-Whitney.

No se apreciaron diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos (Tabla 1).

Variable	Todos los pacientes n=37	Defunciones n=12	Sobrevivientes n=25	Valor <i>p</i>
Edad, años (±SD)	39.51 (12.59)	39.83 (10.65)	39.36 (13.63)	0.90
Hombres, n (%)	23 (62)	9 (75)	14 (56)	0.35
IMC (IQR ₂₅₋₇₅)	29.36 (27.1-33.3)	31.15 (27.2-35.2)	28.93 (26.9-32.3)	0.45
Tabaquismo, n (%)	21 (57)	8 (67)	13 (52)	0.68
T. a hospitalización, días (IQR ₂₅₋₇₅)	7 (2-21)	5.5 (3-13)	7 (2-21)	0.58
T. disnea-defunción, días (IQR ₂₅₋₇₅)	16 (1-38)	11 (6-22)	20 (1-38)	0.08
Temperatura, °C (±SD)	37.15 (0.8)	37.13 (1)	37.16 (0.7)	0.92
Frecuencia cardíaca, lpm (±SD)	102 (18)	101 (18)	103 (18)	0.81
Pulso-oximetría, % (±SD)	75.16 (10.1)	72.67 (10.0)	76.36 (10.2)	0.31
PaO ₂ /FiO ₂ (IQR ₂₅₋₇₅)	190 (161-248)	186 (161-214)	202 (174-253)	0.51
SP-D, ng/mL (IQR ₂₅₋₇₅)	434 (105-776)	630 (439-931)	172 (56-476)	0.02

Tabla 1. Características generales de la población. Se muestran estadísticas de sobrevivientes y fallecidos a 28 días.

Análisis de SP-D en suero

a) *SP-D en casos de neumonía por Influenza A H1N1 vs controles sanos no emparentados.*

Se compararon las concentraciones séricas de SP-D de los casos con sus contactos sanos pareados no emparentados. La variable SP-D no mostró distribución normal. La mediana de la concentración sérica de SP-D del grupo de pacientes fue 423.60 ng/mL (IQR₂₅₋₇₅ 77.67 – 790.97 ng/mL) vs 49.54 ng/mL (IQR₂₅₋₇₅ 14.23 – 118.97 ng/mL) para el grupo control (U de Mann-Whitney, $p < 0.0001$, Gráfico 1).

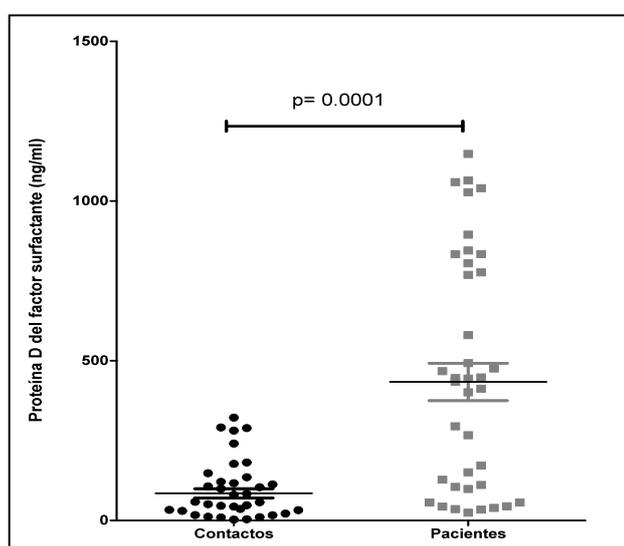


Gráfico 1. Comparación de concentraciones séricas de SP-D entre pacientes y contactos intradomiciliarios no emparentados.

b) *Concentraciones séricas de SP-D en la población de estudio.*

Al analizar a la población, no se apreciaron diferencias significativas entre mujeres 280 ng/mL (IQR₂₅₋₇₅ 105 – 476 ng/mL) y hombres 488 ng/mL (IQR₂₅₋₇₅ 56 – 805 ng/mL, U de Mann-Whitney $p < 0.38$) ó entre fumadores 444 ng/mL (IQR₂₅₋₇₅ 56 – 776 ng/mL) vs no fumadores 353 ng/mL (IQR₂₅₋₇₅ 119 – 787 ng/mL, U de Mann-Whitney $p < 0.98$).

c) Correlación de SP-D con variables fisiológicas.

Se aplicó correlación de Spearman para determinar la asociación entre las concentraciones séricas de SP-D y variables clínicas como índice de masa corporal, superficie corporal, tiempo de apoyo ventilatorio mecánico, leucocitos en sangre a las 24, 48 y 72 horas, índice PaO_2/FiO_2 , puntaje de escalas SOFA (al ingreso, 24, 48 y 72 horas) y APACHE II (al ingreso). En la matriz obtenida, destaca la correlación entre SP-D y el recuento leucocitario a las 72 horas ($r = 0.32$). El resto de las asociaciones no presentó significancia estadística.

d) SP-D en suero y progresión a insuficiencia respiratoria aguda.

En quienes desarrollaron insuficiencia respiratoria aguda ($n=33$), las concentraciones séricas de SP-D fueron de 446.33 ng/mL (IQR₂₅₋₅₇ 56.86 – 805.26) mientras que los pacientes que no presentaron esta complicación ($n=4$) tuvieron una mediana de 233.51 ng/mL (IQR₂₅₋₇₅ 161.64 – 348.16). No se observó diferencia estadística entre ambos grupos (U de Mann Whitney $p < 0.43$, Gráfico 2).

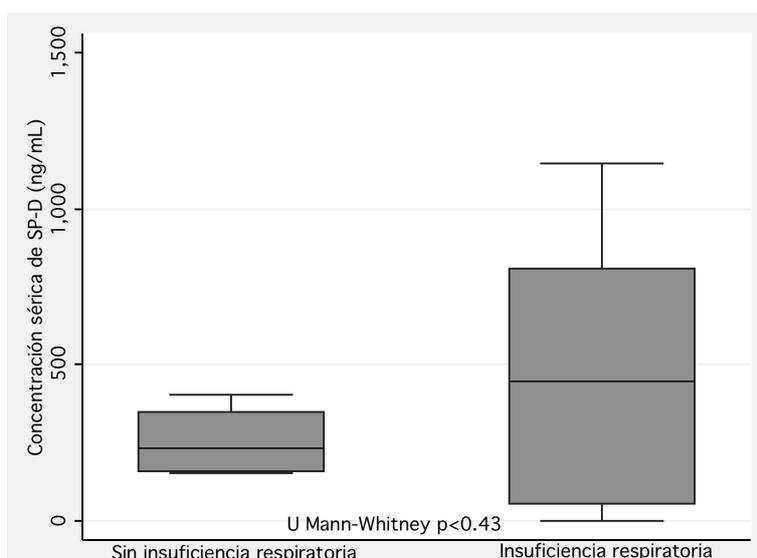


Gráfico 2. Comparación de las concentraciones séricas de SP-D de los casos con neumonía por Influenza A H1N1 en función de la progresión a insuficiencia respiratoria.

e) SP-D en suero y mortalidad a 28 días.

El análisis entre supervivientes (n=25, SP-D 172.22 ng/mL, IQR₂₅₋₇₅ 56.54 – 476.04 ng/mL) y fallecidos a 28 días (n=12, SP-D 630.84 ng/ml, IQR₂₅₋₇₅ 439.27 – 931 ng/mL) mostró diferencia estadísticamente significativa para el grupo de defunciones (U de Mann-Whitney $p < 0.02$, Gráfico 3).

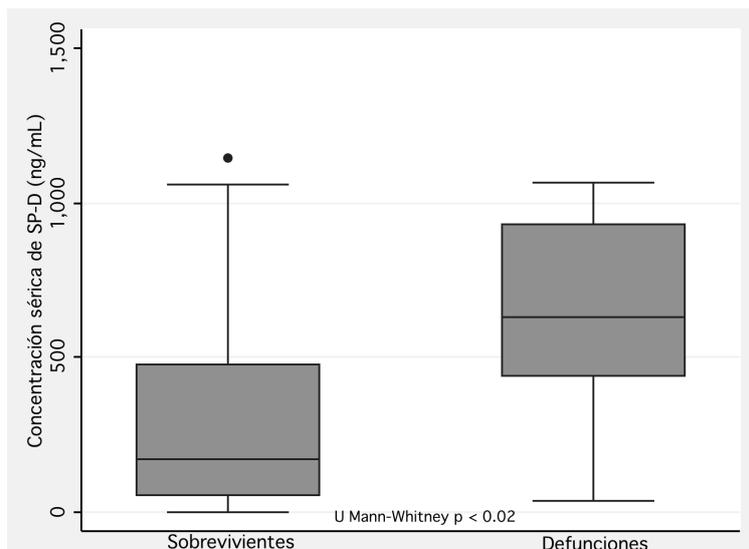


Gráfico 3. Comparación de las concentraciones séricas de SP-D de los casos con neumonía por Influenza A H1N1 en función de la mortalidad a 28 días.

f) Análisis de Curvas receptor-operador (ROC).

I. SP-D como predictor de insuficiencia respiratoria.

Se construyó una curva ROC para conocer el valor predictivo de las concentraciones séricas de SP-D para el desarrollo de insuficiencia respiratoria. El área bajo la curva fue 0.62 (IC_{95%} 0.45 – 0.79), el mejor desempeño de la prueba tuvo sensibilidad de 60.61% y especificidad de 75%, el punto de corte de SP-D para tales valores fue ≥ 401.531 ng/mL (razón de verosimilitud positiva de 2.42 : 1). Mediante el teorema de Bayes se

calculó un valor predictivo positivo de 92.69%, el valor predictivo negativo fue de 26.66%.

II. SP-D como predictor de mortalidad a 28 días.

El análisis ROC para SP-D en suero como predictor de mortalidad a 28 días, obtuvo un área bajo la curva de 0.73 (IC_{95%} 0.56 – 0.86), su mejor desempeño se observó a un valor de sensibilidad de 83.33% y especificidad de 64%. Este punto de corte se estableció con SP-D \geq 434.511 ng/mL y coincidió con la razón de verosimilitud positiva máxima para esta prueba (2.31:1). Los valores predictivos positivo y negativo derivados por teorema de Bayes fueron de 70.67% y 78.74% respectivamente (Gráfico 4).

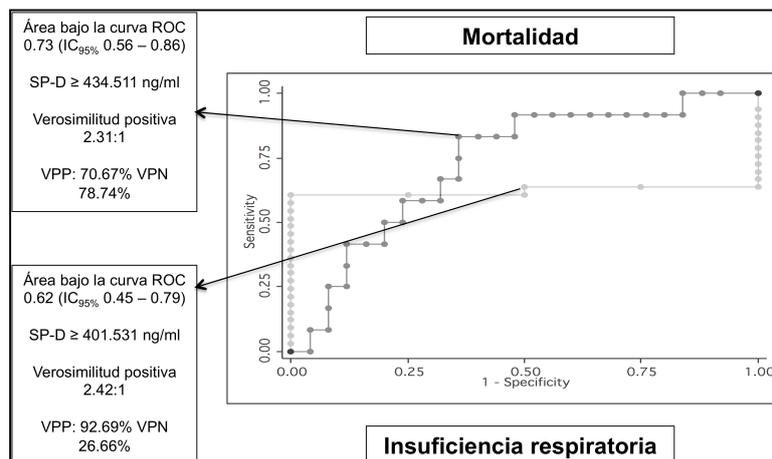


Gráfico 4. Análisis receptor-operador (ROC) de SP-D en suero como predictor de insuficiencia respiratoria y mortalidad a 28 días. Se presentan los valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) para cada desenlace.

g) Cálculo de medidas de asociación

I. Riesgo de desarrollar insuficiencia respiratoria.

Se calculó el riesgo de desarrollar insuficiencia respiratoria con los métodos de tabla de 2 x 2 (riesgo relativo, RR) y regresión de Cox (*Hazard ratio*, HR), mediante la creación de variables dicotómicas de exposición a diferentes concentraciones séricas de SP-D.

Encontramos que el valor de concentración con mayor relevancia clínica para este desenlace se estableció en >400 ng/mL, asociado a un RR de 1.17 (IC_{95%} 0.93 – 1.48, $p < 0.29$) y HR de 1.72 (IC_{95%} 0.85 – 3.46, $p < 0.13$), ninguna de estas mediciones logró significancia estadística.

II. Riesgo de mortalidad a 28 días.

El riesgo de fallecimiento a 28 días en función de SP-D fue calculado con los métodos descritos para insuficiencia respiratoria (sección anterior), observando que los pacientes con valores ≥ 250 ng/ml presentaron un valor de RR= 6.69 (IC_{95%} 1.53 – 29.23, $p < 0.013$) y HR= 8.27 (IC_{95%} 1.07 – 64.13, $p < 0.043$).

h) Análisis de sobrevida

I. Estimador de Kaplan y Meier para el desarrollo de insuficiencia respiratoria aguda, dependiente de las concentraciones séricas de SP-D

El análisis para determinar la probabilidad de desarrollar insuficiencia respiratoria a 28 días fue realizado con un valor crítico de SP-D ≥ 250 ng/mL. El estimador de la función de falla no mostró diferencias estadísticas entre los grupos de expuestos y no expuestos (Log rank, $p < 0.94$, Gráfico 5).

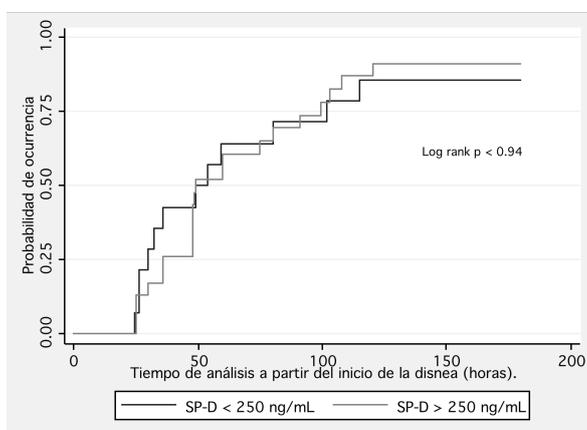


Gráfico 5. Curva de Kaplan-Meier para el desarrollo de insuficiencia respiratoria en pacientes con neumonía por Influenza A H1N1. Punto de corte: SP-D >250 ng/mL.

II. Función de Kaplan y Meier (S_{K-M}) para sobrevivida a 28 días, dependiente de las concentraciones séricas de SP-D

Se analizó la probabilidad de sobrevivida a 28 días categorizando a la población en dos grupos, teniendo como valor crítico SP-D ≥ 250 ng/mL. El grupo con concentraciones < 250 ng/mL presentó un $S_{K-M} = 0.91$ (IC_{95%} 0.51 - 0.98) mientras que los pacientes con valores ≥ 250 ng/mL tuvieron una probabilidad $S_{K-M} = 0.38$ (IC_{95%} 0.16 - 0.61), esta diferencia implicó significancia estadística (Log rank $p < 0.021$, Gráfico 6).

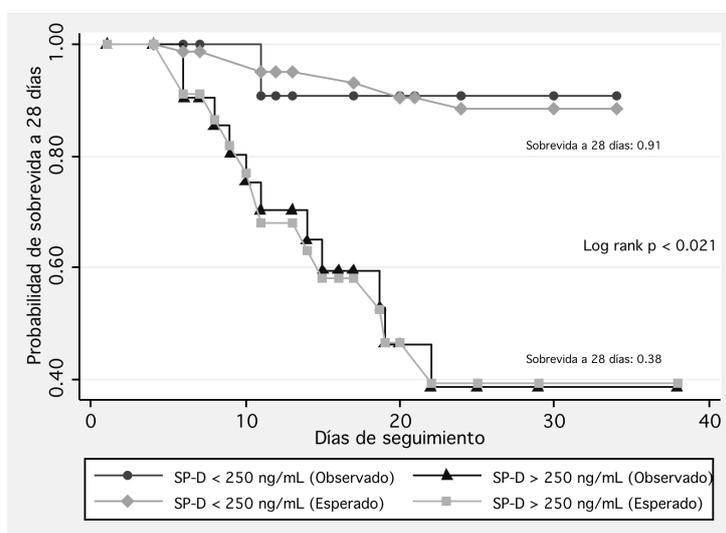


Gráfico 6. Curva de Kaplan y Meier para la función de sobrevivida a 28 días en pacientes con neumonía por Influenza A H1N1 (Valores observados). Punto de corte: SP-D ≥ 250 ng/mL. Se realizó la comparación gráfica con el cálculo por regresión de Cox (Valores esperados).

III. Regresión de Cox para las concentraciones de SP-D y el riesgo de mortalidad a 28 días.

El análisis mediante el modelo de riesgos proporcionales de Cox para SP-D en suero como variable continua estableció un HR= 1.00154 (IC_{95%} 1.000046 – 1.0031, $p < 0.043$) por unidad de incremento (ng/mL).

DISCUSIÓN

La pandemia por Influenza A H1N1 de 2009 significó en México un problema de Salud Pública, con la mayor de mortalidad reportada a nivel mundial^(8,9).

Realizamos un estudio para determinar las concentraciones séricas de proteína D del factor surfactante en una cohorte de 37 pacientes de este brote pandémico y establecer su asociación con insuficiencia respiratoria y muerte, éstos se presentaron en 89% y 32% respectivamente. Se observaron diferencias significativas en las concentraciones séricas de SP-D de los casos de neumonía respecto a sus controles intradomiciliarios así como en los sobrevivientes y fallecidos a 28 días. El valor crítico de concentración para este desenlace se estableció en 250 ng/mL.

La proteína SP-D ha sido postulada como un potencial biomarcador de severidad en otras enfermedades pulmonares^(15,18,21,29). Greene y cols. estudiaron el comportamiento de las proteínas A, B, C y D del surfactante en LBA y suero de sujetos sanos, pacientes en riesgo de insuficiencia respiratoria y casos de SIRA. Se observó incremento de las concentraciones séricas de SP-D en los pacientes con SIRA los días 1, 3 y 7 de evolución del padecimiento. Adicionalmente, los pacientes que fallecieron presentaron valores de SP-D mayores respecto a los sobrevivientes (Gráfico 7). En perspectiva, consideramos que estos resultados apoyan el sentido de nuestras observaciones sobre la capacidad predictora de SP-D para mortalidad en pacientes con daño pulmonar agudo⁽¹⁸⁾.

Winkler y cols. investigaron la asociación de SP-D en suero y LBA con parámetros espirométricos (volumen espirado al primer segundo, VEF1 y su relación con la capacidad vital forzada, VEF1/CVF) en sujetos sanos, fumadores tempranos (hábito menor de 10 años), fumadores crónicos (hábito mayor de 20 años) y pacientes con

enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En los casos de EPOC, SP-D correlacionó inversamente con VEF1 y VEF1/CVF, su determinación en LBA fue significativamente menor en estos pacientes y fumadores crónicos. Por el contrario, las concentraciones de la proteína en suero fueron mayores en ambos grupos respecto a sujetos sanos y fumadores tempranos. La determinación sérica de SP-D en tres momentos de un reto de ejercicio aeróbico de 5 minutos demostró incremento persistente de sus concentraciones en los casos de EPOC comparativamente a los fumadores crónicos. En conjunto, estas observaciones fueron consideradas por los autores como evidencias que sustentan la teoría de la traslocación de la proteína al capilar favorecida por el incremento de la permeabilidad alveolar en estados inflamatorios o daño estructural⁽²¹⁾.

Sin y cols. realizaron un estudio piloto en 23 pacientes con EPOC para determinar la asociación entre SP-D en suero y parámetros espirométricos al inicio del estudio y a los 3 meses. El VEF1 de estos pacientes se asoció inversamente con las concentraciones séricas de SP-D y el mayor descenso del logaritmo de concentración a 3 meses se relacionó con mejoría en la percepción del estado de salud por los pacientes⁽³¹⁾.

En 2008, Lin y cols. investigaron la importancia clínica de SP-D y el antígeno Kerbs Von Lungren 6 (KL-6) en LBA y suero de 15 pacientes con proteinosis alveolar idiopática comparándolos con 48 controles portadores de neumopatías intersticiales (vasculitis, neumonitis intersticial, sarcoidosis) y 20 sujetos sanos. El perfil de citocinas en LBA y suero mostró concentraciones mayores para los pacientes con proteinosis alveolar respecto los dos grupos control, SP-D presentó niveles significativamente mayores en LBA y suero en comparación a los controles sin enfermedad pulmonar⁽³²⁾.

Takahashi y cols. en el año 2000 estudiaron la significancia clínica de las proteínas A y D del surfactante en 52 pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. Determinaron la asociación entre su concentración en suero, la presencia radiológica de alveolitis y la mortalidad a 3 años. Se observó correlación inversa de SP-D en suero con la capacidad pulmonar total y la evidencia de colapso pulmonar en tomografía computarizada de alta resolución⁽³³⁾.

En otro estudio de fibrosis pulmonar idiopática, Greene y cols. encontraron que ambas proteínas (A y D) presentan mayor concentración sérica en esta enfermedad respecto a otras patologías pulmonares como el síndrome de insuficiencia respiratoria aguda y la sarcoidosis. Adicionalmente, existió correlación directa entre SP-A, SP-D y las anomalías radiológicas. El análisis de regresión de Cox estableció asociación inversa entre SP-D en suero y la supervivencia a 5 años⁽³⁰⁾.

Un trabajo realizado por el grupo multicéntrico ARDS Network en 2003 reportó asociación directa de las concentraciones séricas de SP-D con un menor tiempo libre de ventilación mecánica y fallas orgánicas así como con la mortalidad a 28 días en pacientes con síndrome de insuficiencia respiratoria aguda⁽³⁴⁾.

En tendencia biológica con estas investigaciones, las concentraciones séricas de SP-D en nuestros pacientes con neumonía por influenza A H1N1 2009 se asociaron de forma directa con el riesgo de mortalidad a 28 días. De acuerdo con nuestro conocimiento actual, no se dispone de otros estudios que evalúen alguna proteína del surfactante en ese brote pandémico.

La inmunidad innata tiene un papel importante en las etapas iniciales de las infecciones por los virus Influenza A, principalmente ante la aparición de cepas recombinantes con nuevos tipos de HA y NA contra las cuales no se posee respuesta inmunológica. En

modelos experimentales se ha descrito la capacidad de SP-D para opsonizar a los virus Influenza A, limitando su diseminación y replicación^(2,15-17,19,20,22-25).

Nuestras observaciones sobre la asociación de SP-D y el riesgo de mortalidad en el grupo de estudio sugieren que la molécula tiene utilidad como biomarcador en la infección por virus influenza A. Proponemos lo anterior al considerar la afinidad de SP-D por la HA viral, su mayor expresión específica pulmonar y que se encuentra libre en el fluido alveolar. El daño por estrés inflamatorio incrementa la permeabilidad de la membrana alveolo-capilar, lo que favorece el paso de la proteína hacia la sangre gracias a su hidrosolubilidad. Por lo tanto, asumimos que una mayor concentración sérica de SP-D refleja mayor magnitud del daño pulmonar y posiblemente incremento en la mortalidad^(15-18,21,23).

Nuestro trabajo se realizó en un hospital especializado en enfermedades respiratorias. Su carácter unicéntrico y el tamaño muestral limitan la generalización de sus conclusiones por la presencia potencial de sesgos de referencia y selección. Esto se apoya al comparar la mortalidad en nuestro grupo (32.43%) con la reportada en la población mexicana (0.4%), pues en el INER se admitió a pacientes con mediana de evolución del padecimiento de 7 días y manifestaciones clínicas más severas^(8,9). Finalmente, el contar únicamente con la determinación de SP-D al ingreso no permitió valorar el comportamiento de sus concentraciones a lo largo de la evolución.

Consideramos que la aplicabilidad de nuestros resultados deberá corroborarse en investigaciones multicéntricas que involucren a un mayor número de pacientes, con mediciones seriadas de SP-D y mayor tiempo de seguimiento.

Estos hallazgos generan la posibilidad de investigar la importancia clínica de SP-D en otras enfermedades como el síndrome de insuficiencia respiratoria aguda y neumonías por patógenos diversos.

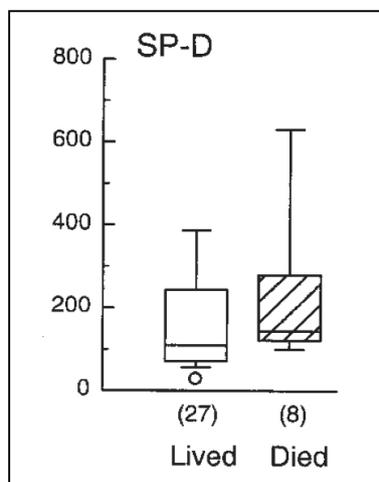


Gráfico 7. Tomado de Greene y cols.⁽¹⁸⁾. Comparación de las concentraciones séricas de SP-D en ng/mL (día 1) entre sobrevivientes y fallecidos en un grupo de pacientes con SIRA.

CONCLUSIÓN

El presente estudio sugiere que en la neumonía por el virus influenza A H1N1 2009 las concentraciones séricas de SP-D se asocian de forma directa con la mortalidad a 28 días. Esta proteína es un potencial biomarcador del pronóstico en esta infección. Se requiere la validación de los resultados en estudios con mayor tamaño muestral y determinaciones seriadas.

REFERENCIAS

1. Meunier I, Pillet S, Simonsen JN, Von Messling V. Influenza pathogenesis: lessons earned from animal Studies with H5N1, H1N1 Spanish, and pandemic H1N1 2009 influenza. *Crit Care Med* 2010;38(Suppl.) doi: 10.1097/CCM.0b013e3181c8b4d5
2. Rothberg MB, Haessler SD. Complications of seasonal and pandemic influenza. *Crit Care Med* 2010;38(Suppl.) doi: 10.1097/CCM.0b013e3181c92eeb
3. Shinde V, Bridges CB, Uyeki TM, Shu B, Balish A, Xu Xiyan, et al. Triple-reassortant Swine Influenza A (H1), in humans in the United States, 2005-2009. *N Engl J Med* 2009;36010.1056/NEJMoa0903812
4. Schnitzler, S. Schnitzler P. An update on swine-origin influenza virus A/H1N1: a review. *Virus Genes* 2009;39:279-292
5. Sullivan SJ, Jacobson RM, Dowdle WR, Poland GA. 2009 H1N1 Influenza. *Mayo Clin Proc* 2010;85(1):64-76
6. Arias CF, Escalera-Zamudio M, Soto-Del Río M, Cobián-Güemes AG, Isa P, López S. Molecular anatomy of 2009 Influenza Virus A (H1N1). *Arch Med Res* 2009;40:643-654
7. Miotto O, Heiny AT, Albrecht R, García-Sastre A, Tan TW, August JT, et al. Complete-proteome mapping of human Influenza A adaptive mutations: Implications for human transmissibility of zoonotic strains. *PLoS ONE* 2010; 5(2): e9025. doi:10.1371/journal.pone.0009025
8. Perez-Padilla R, De la Rosa-Zamboni D, Ponce de León S, Hernandez M, Quiñones-Falconi F, Bautista E, et al. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med* 2009;361(7):680-9

9. López-Cervantes M, Venado A, Moreno A, Pacheco-Domínguez R, Ortega-Pierres G. On the Spread of the novel influenza A (H1N1) virus in Mexico. *J Infect Dev Ctries* 2009;3(5):327-330
10. Bogglid AK, McGeer AJ. Laboratory diagnosis of 2009 influenza A virus. *Crit Care Med* 2010;38(Suppl.) doi: 10.1097/CCM.0b013e3181cd7bb2
11. Barkhodarian A, Iyer N, Shapshak P, Somboowit C. Influenza 2009 pandemic: Cellular immune-mediated surveillance modulated by TH17 & tregs. *Bioinformatics* 2011;6(1):39-40
12. Chan MC, Cheung CY, Chui WH, Tsao SW, Nicholls JM, Chan YO et al. Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. *Resp Res* 2005;6:135
13. Chan RW, Yuen KM, Yu WC, Ho CC, Nicholls JM, Malik JS, et al. Influenza H5N1 and H1N1 virus replication and innate immune responses in bronchial epithelial cells are influenced by the state of differentiation. *PLoS ONE* 2010;5(1): e8713. doi:10.1371/journal.pone.0008713
14. Mukherjee S, Vipat V, Mishra A, Pawar S, Chakrabarti A. Pandemic (H1N1) 2009 influenza virus induces weaker host immune responses in Vitro: a possible mechanism of high transmissibility. *Viol J* 2011;8:140
15. Crouch E. Surfactant protein D and pulmonary host defense. *Respir Res* 2000;1:93-108
16. Gallo R, Nizet V. Innate barriers against infection and associated disorders. *Drug Discov Today Dis Mech* 2008;5(2):145-152
17. Pastva A, Wright J, Williams K. Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D. Implications in lung disease. *Proc Am Thor Soc* 2007;(4):252-257

18. Greene K, Wright J, Steinberg K. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1843-1850
19. Madsen J, Kliem A, Tornoe I, Skjodt K, Koch C, Holmskov U. Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues. *J Immunol* 2000;164:5866-5870
20. Beharaka A, Gaynor C, Kang B, Voelker D, McCormack F, Schlesinger L. Pulmonary Surfactant Protein A Upregulates activity of the mannose receptor, a pattern recognition receptor expressed on human macrophages. *J Immunol* 2002;169:3565-3573
21. Winkler C, Atochina-Vasserman E, Holz O, Beers MF, Erpenbeck VJ, Kyug N, et al. Comprehensive characterisation of pulmonary and serum surfactant protein D in COPD. *Resp Res* 2011;12:29
22. Hartshorn K, White M, Tecele T, Sorensen G, Holmskov U, Crouch E. Viral aggregating and opsonizing activity in collectin trimers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;298:L79-L88
23. Hawgood S, Brown C, Edmonson J, Stumbaugh A, Allen L, Goerke J, et al. Pulmonary Collectins Modulate Strain-Specific Influenza A Virus infection and host responses. *J Virol* 2004;78(16):8565-8572
24. Levine AM, Whitsett J, Hartshorn K, Crouch E, Korfhagen T. Surfactant protein D enhances clearance of influenza A virus from the lung in vivo. *J Immunol* 2001;167:5868-5873
25. Hartshorn K, White M, Crouch E. Contributions of the N- and C-Terminal domains of surfactant protein D to the binding, aggregation, and phagocytic uptake of bacteria. *Infect Immun* 2002;70(11):6129-6139

26. Hansen S, Lo B, Evans K, Neophytou P, Holmskov U, Wright J. Surfactant protein D augments bacterial association but attenuates major histocompatibility complex class II presentation of bacterial antigens. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36:94-102
27. Zhang L, Ikegami M, Korfhagen T. Neither SP-A nor NH2-terminal domains of SP-A can substitute for SP-D in regulation of alveolar homeostasis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L181-L190
28. Guo C, Atochina-Vasserman E, Abramova E. S-Nitrosylation of Surfactant Protein-D controls inflammatory function. *PLoS Biol* 2008;6(11):2414-2423
29. Takahashi H, Kuroki Y, Tanaka H, Saito T, Kurokawa K, Chiba H, et al. Serum levels of Surfactant Proteins A and D are useful biomarkers for interstitial lung disease in patients with progressive systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:258-263
30. Greene K, King Jr T, Juroki Y, Bucher-Bartelson B, Hunninghake L, Newman L, et al. Serum surfactant proteins -A and -D as biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2002;19:439-446.
31. Sin D, Leung R, Gan W, Man S. Circulating surfactant protein D as a potential lung-specific biomarker of health outcomes in COPD: a pilot study. *BMC Pulmonary Medicine* 2007;7(13) doi:10.1186/1471-2466-7-13.
32. Lin F, Chen Y, Chang S. Clinical importance of bronchoalveolar lavage fluid and blood cytokines, surfactant protein D, and Kerbs von Lungren 6 antigen in idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Mayo Clin Proc* 2008;83(12):1344-1349.
33. Takahashi H, Fujishima T, Koba H, Murakami S, Kurokawa K, et al. Serum surfactant proteins A and D as prognostic factors in idiopathic pulmonary

fibrosis and their relationship to disease extent. *Am J Resp Crit Care Med* 2000;(162):1109-1114.

34. Eisner M, Parsons P, Matthay M, Ware L, Greene K, the acute respiratory distress syndrome network. Plasma surfactant protein levels and clinical outcomes in patients with acute lung injury. *Thorax* 2003;58:983-988

ANEXO 1. FORMATO DE RECOLECCIÓN

ASOCIACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE LA PROTEÍNA "D" DEL FACTOR SURFACTANTE Y EL RIESGO DE PROGRESIÓN A INSUFICIENCIA RESPIRATORIA AGUDA EN PACIENTES CON NEUMONÍA POR EL VIRUS INFLUENZA A H1N1 2009. DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN. INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

Formato de Recolección de datos.

No. Progresivo _____

Nombre: _____ Género: M F Edad: _____

Peso _____ Talla _____

Tabaquismo S N Cigarros/día _____ Años _____ IT _____ SC _____

IMC _____

Tiempo de inicio de síntomas _____

Tratado _____ Inmunizado _____ Fecha _____ Embarazo _____ SDG _____

Enf Respiratorias	Si	No	Dx							Tx:	
Enf Cardiovascular	Si	No	Dx							Tx:	
Otros Antecedentes	Si	No	Dx							Tx:	
Sv's al ingreso	Temp		TA	FC	FR	Uresis 24h	PVC	DxTx	SpO2		
	Min										
Evol hemodinámica 24h	Max										
		TAS	TAD	TAM	Dopamina			FC	PVC	Lac	U/k/h
	Min				Norepi						
	Max				Dobuta						
				Levosimend							

GSA Inicial

Evol Respiratoria	Ingreso y 24 horas		48 horas		72 horas		7 días	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
FR								
SpO2								
Rx Torax								
Ventilación mecánica								
Modo								
Fio2								
PEEP								
VT								
PI								
Pmax								
pH								
HCO3								
EB								
paO2								
pCO2								

SaO2								
IK								
Pplat								

Clínico	24 h	48 h	72 h	5 d	7 d			
Temp								
TA								
TAM								
FR								
FC								
UKH								
Dopamina								
Dobutamina								
Norepinefrina								
Levosimendan								
Vasopresina								
Sedación								
Relajante								
Desenlaces								
Intubación	Si No	Horas						
SIRA S N	Progresión Hr		Días Duración			EACC 94	Si	

Días de AMV								
UCI	Si	No						
Días UCI	Estancia d							
Extubación	Si	No	Días					
Fracaso Extub	Si	No	Días a frac	Días reintub		Éxito reextub		
Alta UCI	Si	No						
Motivo	Mejoría	Defunción	Otro					
Alta Hosp	Si	No	Mejoría	Defunción		Días a		
Defunción	28 d si	28d No						
Sobreinfecc	Si	No	Germen(es)		Días a dx			
1ª dosis diur	Tiempo hr	días	dosis mg		dosis total		días Tx	
TSFR	Si No	días		Tipo	HD	DP	HDF	
STD	Alto		Bajo		Tiempo a			
Delirium	Si No							

Laboratorio	Ingreso	24h	48h	72h	5 días	7días		
Hb								
Hto								
leuc								
neut								
linf								
plaq								
glucosa								
Cr								
urea								
Na								
K								
Cl								

TGO									
TGP									
CK									
MB									
lac									
DHL									
BT									
BD									
TP									
TTP									
INR									
UKH									

Comentarios _____

ANEXO 2. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

México, Distrito Federal a ____ de _____ del 20__

Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado:

Asociación entre las concentraciones séricas de la proteína “D” del factor surfactante y el riesgo de progresión a insuficiencia respiratoria aguda en pacientes con neumonía por el virus influenza A H1N1 2009.

Registrado ante el Comité Local de Investigación o la CNIC con el número:

El objetivo del estudio es:

Correlacionar las concentraciones séricas de SP-D con el tiempo de progresión a falla respiratoria en pacientes con neumonía por Influenza A H1N1.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en:

Permitir la determinación de la proteína SP-D en muestras de suero previamente tomadas y almacenadas en criopreservación

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes y molestias derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:

NINGUNO.

El Investigador Responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del paciente

Nombre, firma y matrícula del Investigador Responsable.

Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio:

Testigos
