



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DELEGACIÓN SUR DEL DISTRITO FEDERAL
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI
"DR. BERNARDO SEPULVEDA GUTIERREZ"

TITULO

**EFFECTO DEL CA⁺⁺ CITOSÓLICO EN LA PRODUCCIÓN DE IL6 DE CÉLULAS
MONONUCLEARES EN PACIENTES CON HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO Y
POSPARATIROIDECTOMÍA**

LUGAR:
CIUDAD DE MEXICO

P R E S E N T A
DRA. DULCE PAOLA GRAJALES GARCIA

PARA OBTENER EL DIPLOMA
EN LA ESPECIALIDAD DE
NEFROLOGIA

TUTOR:
DR. PEDRO TRINIDAD RAMOS

CO-TUTOR:
DRA. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DOCTORA

VICTORIA MENDOZA ZUBIETA

JEFE DE LA DIVISIÓN DE EDUCACIÓN EN SALUD
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI

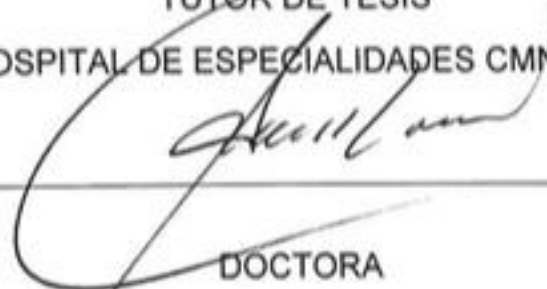


DOCTOR

PEDRO TRINIDAD RAMOS

JEFE DE SERVICIO DE NEFROLOGIA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACION EN NEFROLOGIA
TUTOR DE TESIS

UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI



DOCTORA

LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUIMICA
CO-TUTOR DE TESIS

UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI





INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS



Dictamen de Aprobado

Comité Local de Investigación en Salud **3601**.
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES Dr. BERNARDO SEPULVEDA GUTIÉRREZ, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

Registro COFEPRIS 17 CI 09 015 034
Registro CONBIOÉTICA CONBIOETICA 09 CEI 023 2017082

FECHA Miércoles, 12 de junio de 2019

Dr. Pedro Trinidad Ramos

PRESENTE

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título **Efecto del Ca++ citosólico en la producción de IL6 de células mononucleares en pacientes con hiperparatiroidismo secundario y posparatiroidectomía** que sometió a consideración para evaluación de este Comité, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A.P.R.O.B.A.D.O.**

Número de Registro Institucional

R-2019-3601-109

De acuerdo a la normativa vigente, deberá presentar en junio de cada año un informe de seguimiento técnico acerca del desarrollo del protocolo a su cargo. Este dictamen tiene vigencia de un año, por lo que en caso de ser necesario, requerirá solicitar la reaprobación del Comité de Ética en Investigación, al término de la vigencia del mismo.

ATENTAMENTE

Dr. Carlos Freddy Cuevas García
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud No. 3601

Incipiente

IMSS

DATOS DEL ALUMNO		DATOS DEL ALUMNO	
APELLIDO PATERNO:		GRAJALES	
APELLIDO MATERNO:		GARCIA	
NOMBRES:		DULCE PAOLA	
TELEFONO:		56 27 69 00 EXTENSION: 21752	
UNIVERSIDAD:		UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO	
FACULTAD:		MEDICINA	
CARRERA:		NEFROLOGIA	
N° DE CUENTA:		518210096	
DATOS DEL ASESOR		DATOS DEL ASESOR	
APELLIDO PATERNO:		TRINIDAD	
APELLIDO MATERNO:		RAMOS	
NOMBRE:		TRINIDAD	
DATOS DE LA TESIS		DATOS DE LA TESIS	
TITULO:		EFEECTO DEL CA⁺⁺ CITOSÓLICO EN LA PRODUCCIÓN DE IL6 DE CÉLULAS MONONUCLEARES EN PACIENTES CON HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO Y POSPARATIROIDECTOMÍA 22	
PAGINAS:		2020	
AÑO:		R- 2019-3601-109	
NUMERO DE REGISTRO:			

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida y salud!

A mis padres por el apoyo y paciencia constante, pese a la distancia siempre tuvieron las palabras correctas para impulsarme y por confiar en mi.

A mis hermanos por las porras.

A mis maestros, a los que admiro, gracias por crear en mi la ilusión de lo que ahora soy, y por confiar en mi sin ser perfecta durante mi formación, me quedo con todo lo bueno de cada uno.

A mis amigos, que ahora forman parte de mi vida, por el apoyo emocional e intelectual en aquellas situaciones difíciles que quedaran siempre para contarse.

Al Fondo de Investigación en Salud por hacer posible este trabajo.

Gracias.

INDICE

I.-RESUMEN	7
II.-ANTECEDENTES	9
III.-JUSTIFICACIÓN	13
IV.-PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA	13
V.-OBJETIVO GENERAL	14
VI.-HIPÓTESIS	14
VII.-MATERIAL Y MÉTODOS	15
DISEÑO DEL ESTUDIO	15
UNIVERSO DE TRABAJO	15
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	16
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	16
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.	16
RECOLECCIÓN DE DATOS CLÍNICOS	17
RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS	17
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	18
VIII.- RESULTADOS	19
IX.- DISCUSIÓN.	25
X.-CONCLUSION	27
X.- BIBLIOGRAFIA	28

I.-RESUMEN

Introducción: En estudios previos se ha demostrado la asociación entre niveles altos de la hormona paratiroidea (PTH) e interleucina 6 (IL6). Según estudios “*in vivo*” y “*ex vivo*” el efecto de la PTH en la producción de la citocina antes mencionada es dosis dependiente. En estudios preliminares en pacientes con hiperparatiroidismo secundario (HPTS) grave, observamos que previo a la paratiroidectomía (PTX), la producción de IL-6 en monocitos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) es significativamente menor respecto a la IL-6 producida por monocitos en respuesta a LPS pos PTX, probablemente debido a la disminución del Ca^{++} en dichas células pos PTX. Por lo que nuestro objetivo fue **determinar la asociación entre el Ca^{++} citosólico y la producción de IL-6 en monocitos ante el estímulo con LPS en pacientes con HPTS y pos PTX.**

Pacientes y métodos: Se estudiaron 32 pacientes y 15 controles, del total de pacientes se incluyeron 22, cualquier género, mayores de 18 años, sin proceso infeccioso activo agudo o crónico, y sin tratamiento inmunosupresor. En total fueron 22 pacientes, de los cuales 12 cursaron con HPTS moderado (**grupo 1**), 10 con HPTS grave (**grupo 2**), estos últimos además se estudiaron intragrupo post paratiroidectomía (**grupo 3**) y se tomaron como control 10 sanos (**grupo 4**).

Se midieron niveles séricos basales de PTH, Ca^{++} , P, Ca total, Albumina, y en su caso niveles pos PTX (54 días en promedio pos PTX). Se realizó un modelo de estimulación con LPS “*ex vivo*” a células mononucleares utilizando fluorocromo sensible a IL6, adicionalmente se midió la producción de otras citocinas como IL1b, IL8, TNF en los 4 grupos. Por otro lado se uso un ionóforo (A23187) y un reactivo Fluo 4 (fluorocromo sensible a Ca^{++} citosólico) que indicó la concentración relativa del mismo con base a la media de la intensidad de fluorescencia (**MIF**). Para ello se tomó la MIF Fluo4 antes y después de la exposición a LPS calculando así la Δ (diferencia de MIF) entre condición basal y estimulada a fin de verificar la capacidad de respuesta de las células a dichos estímulos. El análisis estadístico se realizó con ANOVA y/o Kruskal Wallis entre todos los grupos y en referencia al grupo 2 se comparó con el grupo 3 (intragrupo), que es su propio control (pos PTX) a través de la prueba Wilcoxon.

Resultados: De los 22 pacientes y 10 sanos la mediana de edad fue de 40 años y 28 años respectivamente, el género masculino predominó en 10 de los pacientes con HPTS moderado, mientras que en graves y sanos 5 pacientes fueron hombres. Todos los pacientes con HPTS se encontraban en diálisis crónica, de los pacientes con HPTS grave, 9 en hemodiálisis (HD) y 1 en diálisis peritoneal (DP), en los moderados la relación fue 7:5 respectivamente. La etiología de la ERC predominante en 20 pacientes fue no diabética; y en dos, secundario a diabetes mellitus. Observamos que el HPTS independientemente de la magnitud no modifica la capacidad de respuesta en los monocitos con estímulo LPS para sintetizar citocinas como IL6 ($p= 0.14$), IL1b ($p= 0.25$), IL8 ($p= 0.67$) y TNF ($p= 0.22$) en ninguno de los 4 grupos, al analizar los datos pre y pos PTX con prueba de Wilcoxon pese a la disminución significativa de la PTH ($p= 0.02$) no encontramos correlación con la producción de IL6 ($p= 0.84$), TNF ($p= 0.49$), IL8 ($p= 0.08$) y IL1b ($p= 0.62$); es decir la producción parece no depender de la concentración sérica de PTH biointacta. Por otro lado no encontramos diferencias significativas en los niveles de calcio citosólico máximo ($p= 0.15$) ni en las Δ MIF Fluo Ca^{+2} ($p= 0.15$) sin estímulo, entre grupo 2 y 3, pero sí al comparar al grupo 1 contra 2, en la concentración de calcio citosólico basal y máximo sin estímulo ($p= 0.0007$) y ($p= 0.0099$). Al aplicar el ionóforo A23187 observamos que el MIF fluo 4 aumenta en todos los grupos excepto en el 3, y por tanto el Δ Ca^{+2} ante este proceso es significativamente menor en pacientes con HPTS pos PTX ($p < 0.05$).

Conclusiones: No existe una asociación entre el calcio citosólico y la producción de IL 6 en monocitos de pacientes con HPTS moderado y grave, pero es de interés la observación de la menor Δ Ca^{++} en los pacientes pos PTX probablemente por menor influjo de calcio citosólico al disminuir los niveles de PTH; no obstante, a que este grupo pos PTX recibió reposición intravenosa de calcio, como tratamiento del síndrome de hueso hambriento. Este puede ser motivo para futuros estudios con diseño más robustos y controles a más largo plazo.

II.-ANTECEDENTES

El Hiperparatiroidismo Secundario (HPTS) es una complicación metabólica de la enfermedad renal crónica (ERC), que se observa desde etapas tempranas de la misma.¹ En su patogenia se han demostrado diferentes factores, que incluyen: 1) retención intra y extra celular de fósforo con la progresión del daño renal crónico, que se exagera cuando la tasa de filtrado glomerular (TFG) es $\leq 30\text{ml/min}$. La hiperfosfatemia genera disminución en la conversión de 25-OH vitamina D a 1-25OH₂D₃ o también llamado 1-25 dihidroxicolecalciferol y/o calcitriol, por su efecto inhibitor en la 1 alfa-hidroxilasa, asimismo incrementa la resistencia a la acción calcémica de la PTH, y además estimula de forma directa la síntesis de esta hormona en la célula paratiroidea por mecanismos no bien establecidos, aunado al estímulo del ciclo celular por inhibición de la proteína p21 (proteína inhibidora del ciclo celular),² 2) disminución en la síntesis y secreción de calcitriol, secundario a la pérdida progresiva del parénquima renal, como se mencionó también debido a la retención de fósforo y acidosis metabólica, por lo que hay disminución del efecto directo en la retroalimentación negativa en la célula paratiroidea con incremento en la síntesis de PTH asociada a la hipocalcemia por disminución en la absorción intestinal de calcio. 3) estimulación progresiva en la síntesis de Factor de Crecimiento Fibroblástico 23 (FGF23), con la disminución de la TFG. Esta hormona es producida por los osteocitos, en respuesta al incremento progresivo intra y extra celular de fósforo, y al aumento de la PTH. Sus efectos incluyen la disminución en la síntesis de calcitriol debido a la inhibición y estimulación de la 1-alfa-hidroxilasa y 24-hidroxilasa respectivamente, está última se ha demostrado participa en el aumento del catabolismo del calcitriol.³ Recientemente se ha informado que los niveles elevados de FGF23 contribuyen a la progresión de ERC y a la mortalidad principalmente de tipo cardiovascular.⁴

Estos factores conllevan directa e indirectamente a la hiperplasia paratiroidea inicialmente difusa y su persistencia conlleva a hiperplasia nodular, con menor expresión de receptores tanto de Ca⁺⁺ como de calcitriol, lo que genera refractariedad al tratamiento farmacológico.⁵ Por lo que las medidas terapéuticas deben ser enfocadas a la prevención del desarrollo y tratamiento de HPTS, que incluyen la restricción dietética, quelantes cálcicos y no cálcicos de fósforo, activadores selectivos de receptores de vitamina D,

calcimiméticos en pacientes con HPTS moderado (250-400 pg/ml PTH biointacta) y como última alternativa de no haber respuesta farmacológica en HPTS grave (>400pg/ml de PTH biointacta), la PTX, la cual puede ser subtotal o total con implante.

El HPTS cursa con repercusiones sistémicas, en hueso, produce enfermedad ósea de predominio hiperparatiroideo, generalmente llamada “osteítis fibrosa quística” que se caracteriza por actividad acelerada osteoblástica y osteoclástica con fibrosis medular y alteraciones en el volumen óseo, clínicamente en fases avanzadas se manifiesta por dolor, deformación ósea, y en ocasiones fracturas. A nivel hematológico produce anemia, por diferentes mecanismos, por un lado atribuida al déficit de calcitriol con menor expresión de sus receptores en células progenitoras eritroides lo que afecta la proliferación y maduración de dichas células,⁶ por otro lado a los efectos directos e indirectos de la PTH, dentro de los primeros se incluyen la disminución de la vida media del eritrocito por incremento en su fragilidad osmótica e incremento de Ca^{++} citosólico, mientras que los efectos indirectos son los explicados por aumento de la fibrosis medular, con menor expresión de receptores de eritropoyetina (EPO) en las células progenitoras, y al efecto inhibitorio de citocinas en la eritropoyesis, específicamente IL-6 estimuladas por la PTH.

En adición a los efectos sistémicos del HPTS antes mencionados, es sabido que dentro de las principales causas de mortalidad en los pacientes con Insuficiencia Renal Crónica (IRC) se encuentran las de tipo cardiovascular (CV) e infecciosas, dentro de las primeras incluyen a la cardiopatía isquémica como el infarto agudo al miocardio (IAM), insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), valvulopatías, entre otras. Entre las infecciosas destacan las relacionadas a los accesos para diálisis Crónica (vasculares o peritoneales).

La incidencia elevada de mortalidad CV en los pacientes con ERC y en tratamiento sustitutivo de diálisis crónica es explicada a la aterogénesis acelerada observada en estos pacientes que no solo es debida a los factores de riesgo tradicionales como la diabetes mellitus, hipertensión arterial, dislipidemia, tabaquismo, obesidad, sino también a los factores conferidos a la propia insuficiencia renal crónica, que incluyen a la hiperhomocisteinemia, sobrecarga de volumen, anemia, estado inflamatorio crónico, estrés oxidativo y al HPTS en el que las calcificaciones vasculares y la pérdida de la homeostasis del calcio, fósforo y hormonas calciotrópicas juegan un papel importante.⁷

En diversos estudios se ha demostrado la relación entre el HPTS y el estado inflamatorio crónico en la ERC, evidenciada específicamente en la elevación de PTH y citocinas proinflamatorias que incluyen, IL-6, IL-1 y TNF alfa, aunado al incremento de reactantes de fase aguda, como la PCR. Los niveles elevados de PTH asociados al aumento de IL-6, se explica por la actividad de esta hormona a través de sus receptores en los osteoblastos.⁸ Estudios *in vitro* han demostrado a nivel hepático el incremento en la síntesis de PCR por estimulación principalmente de IL-6 en células hepáticas.⁹ Asimismo estudios *ex vivo* en ratas, han informado que el incremento de IL-6 por infusión de PTH es dosis dependiente.¹⁰ Previa observaciones nuestras demuestran que la corrección de HPTS grave en pacientes, mediante PTX, disminuye los reactantes de fase aguda [PCR, Velocidad de sedimentación globular (VSG), fibrinógeno]. Schifill H. y cols.¹¹ observaron en una serie de pacientes pos PTX disminución de la IL-6, PCR e incremento en los niveles de hemoglobina con menor dosis de EPO, por lo que se concluye que el HPTS contribuye al estado inflamatorio y anémico.

Es del todo conocido que en pacientes con IRC en diálisis crónica cursan con estrés oxidativo, principalmente en hemodiálisis, en los que se ha demostrado la asociación con calcificación coronaria extensa.¹² En un reporte de caso se informó que la PTX reduce marcadamente el estrés oxidativo en un paciente con HPT Primario¹³ y en un estudio observacional realizado en nuestro servicio en pacientes con IRC e HPTS pos PTX hubo descenso significativo de malondialdehído, como biomarcador de estrés oxidativo, con incremento en la actividad de la superóxido dismutasa¹⁴, lo que sugiere que el HPTS es un factor adicional que contribuye al estrés oxidativo.

Por otro lado varios estudios clínicos observacionales y experimentales publicados en las últimas décadas indican que la PTH puede actuar sobre el sistema inmunológico, observándose disfunción de la respuesta inmune adquirida que predispone a los pacientes con ERC a procesos infecciosos. El modo de acción de la PTH en el sistema inmunitario es contrastante, por un lado existen estudios que demuestran que la PTH

inhibe la proliferación celular y la producción de citocinas, mientras que otros autores demuestran lo contrario con aumento en la producción de citocinas.^{15, 16}

Recientemente nosotros observamos que los niveles plasmáticos de IL-6 no cambian en pacientes con HPTS grave pre PTX y pos PTX, sin embargo la producción de esta citocina proinflamatoria se incrementa pos PTX cuando los monocitos son estimulados con LPS, en comparación a la producción de IL-6 en monocitos de pacientes con HPTS grave. Estos hallazgos pudieran ser explicados por la probable disminución de la concentración de Ca^{++} citosólico, y por ende una respuesta celular eficiente, derivado esto del descenso en los niveles de PTH pos PTX.¹⁷

III.-JUSTIFICACIÓN

Una de las principales causas de mortalidad en los pacientes con Insuficiencia Renal Crónica son los procesos infecciosos, atribuidos a alteraciones en la inmunidad celular y humoral, por diferentes causas, que incluyen al estado urémico, desnutrición, exposición, por los accesos de diálisis (peritoneal, vascular) y a las alteraciones del metabolismo óseo-mineral. En estas últimas secundarias entre otras a la elevación de la hormona paratiroidea, que es considerada la principal toxina urémica.

Con base a estudios previos que han demostrado la asociación del estado inflamatorio crónico, estrés oxidativo, con hiperparatiroidismo grave con mejoría pos PTX, aunado a nuestros hallazgos que demostraron una mejor respuesta de los monocitos a la estimulación con LPS, en la producción de IL-6, y que podría ser explicada por la probable disminución del Ca^{++} citosólico, secundario al descenso de la PTH pos PTX. Por lo tanto nuestra pregunta de investigación fue la siguiente:

IV.-PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

¿La concentración de Ca^{++} citosólico secundario a la acción de la PTH se asocia a la producción de IL-6 en monocitos estimulados con LPS de pacientes con HPTS y pos PTX?

V.-OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación entre el Ca^{++} citosólico y la producción de IL-6 ante el estímulo modelo de LPS en pacientes con HPTS moderado, grave y pos PTX.

VI.-HIPÓTESIS

La producción de IL-6 en monocitos estimulados con LPS de pacientes con HPTS y pos PTX es dependiente de la concentración de Ca^{++} citosólico, secundario a la acción de la PTH.

VII.-MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Estudio experimental y longitudinal.

Universo de trabajo

Se estudiaron pacientes del servicio de Nefrología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI “Dr. Bernardo Sepúlveda”, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con diagnóstico de HPTS moderado y grave, que recibieron consulta en el caso del grupo 1 ó fueron ingresados en el departamento de nefrología para paratiroidectomía en el periodo de un año, (Mayo 2019 – Mayo 2020).

CRITERIOS DE SELECCIÓN.

Criterios de inclusión

- Pacientes con HPTS moderado (PTH biointacta ≥ 250 y < 400 pg/ml) y grave (≥ 400 pg/ml) de la consulta externa y sujetos controles.
- Entre 18 y 60 años de edad.
- Cualquier Género
- Que acepten y firmen el consentimiento informado.

Criterios de Exclusión

- Que cursen con proceso infeccioso, activo o crónico, documentado por clínica o por criterios de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.
- Que reciban tratamiento inmunomodulador.
- Con inmunodeficiencias o inmunocompromiso (VIH, hepatitis B o C, o enfermedades autoinmunes.)
- Con enfermedad hemato-oncológica maligna.

Criterios de eliminación.

- Pacientes que abandonen el estudio.

Recolección de datos clínicos

Los datos clínicos se recabaron en una hoja de recolección de datos, donde se incluyó un historial clínico mediante el interrogatorio directo, los estudios bioquímicos (Niveles de PTH) se recogieron del sistema electrónico del centro médico, y el resto (Ca^{++} , P, Ca total, Albumina,) mediante la toma de muestra sanguínea al momento del ingreso, analizados por el laboratorio central de nuestro hospital.

Toda esta información se mantuvo como información confidencial, salvaguardando la intimidad de cada persona participante en el estudio.

Recolección de las muestras

Para los ensayos de producción de IL-6, de aquellos pacientes que cumplieron con los criterios de selección, se tomó una muestra de sangre periférica mediante venopunción con previa asepsia y antisepsia de la zona. La sangre se colectó en sistemas Vacutainer® en tubos con heparina de litio (95 USP/6mL) como anticoagulante, y en caso de pacientes con HPTS grave, se repitió la toma de muestra para realizar mediciones bioquímicas pos PTX (54 días promedio posteriores a la paratiroidectomía)

Metodología del Estudio

Se estudiaron 32 pacientes y 15 controles, del total de pacientes se incluyeron 22, de los cuales 12 cursaron con HPTS moderado (grupo 1), 10 con HPTS grave (grupo 2), de este grupo se estudiaron pos paratiroidectomía (grupo 3) y se tomaron como control 10 sanos (grupo 4) que cumplieron con los criterios de inclusión: cualquier género, mayor de 18 años, sin proceso infeccioso activo agudo o crónico, y sin tratamiento inmunosupresor.

A través de una muestra de sangre periférica obtenida mediante venopunción previa asepsia y antisepsia de la zona, se midieron niveles séricos basales de PTH, Ca^{++} , P, Ca total, Albumina, y en su caso niveles pos PTX (54 días en promedio posterior a la

paratiroidectomía) analizados en el laboratorio central de nuestro hospital, un tubo de heparina de litio (95 USP/6 ml) como anticoagulante, 1 tubo rojo se envió a procesar en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica de nuestro centro. Se realizó un modelo de estimulación con LPS “*ex vivo*” en una placa de 24 pozos, se colocó 200µL de sangre periférica de cada paciente en presencia de PBS estéril (5µL, Control) o LPS (100ng/mL). Las muestras se incubaron 2 horas a 37°C con 5% CO₂ y se les agregó Brefeldina A, posteriormente se incubaron 2 horas más en las mismas condiciones. Una vez terminado el tiempo de incubación, se resuspendieron las células y se recolectaron 50 µL de muestra de cada condición en tres tubos separados, uno como control negativo de tinción (AF), uno como control de fluorescencia menos uno de citocinas (FMO) y un tubo de tinción (T). Se realizó la tinción de superficie incubando los tubos FMO y T con los anticuerpos de identificación αCD14 y αCD16; pasados 15 min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se lavaron las células con 1mL de PBS. Se realizó la tinción intracelular con los reactivos “FIX & PERM Cell Fixation & Cell Permeabilization Kit” (ThermoFisher Scientific, GAS003). Obteniéndose al menos cinco mil monocitos utilizando un citómetro FACSCanto (BD™ Biosciences, San José, CA, USA) equipado con tres láser y el juego de filtros adecuados para la detección de los fluorocromos planteados en el panel. Los inmunofenotipos se determinaron utilizando el programa de análisis citométrico Infinicyt (Cytognos Euroflow). Además se ocupó un fluorocromo sensible a Ca⁺⁺ citosólico (Fluo4), que indicó la concentración del mismo con base en la media de la intensidad de fluorescencia a Fluo4 (MIF Fluo4). Para ello se tomó la MIF Fluo4 antes y después de la exposición a un ionóforo A23187 el cuál tiene la función de incrementar la permeabilidad de las membranas celulares, facilitando el transporte de Ca²⁺ al citosol para su medición, calculamos así la delta (diferencia de MIF entre condición basal y estimulada a fin de verificar la capacidad de respuesta de las células)

Análisis estadístico

Los datos se analizaron través de ANOVA y/o Kruskal Wallis entre pacientes grupo 1, 2, 3, 4, y con referencia al grupo 2 se comparó con el grupo 3 (antes-después) que fue su propio control (pos PTX) a través de Wilcoxon (no paramétrica).

VIII.- RESULTADOS

Se estudiaron 32 pacientes y 10 controles, del total de pacientes se incluyeron 22, de los cuales 12 cursaron con HPTS moderado (grupo 1), 10 con HPTS grave (grupo 2), de este grupo se estudiaron pos paratiroidectomía (grupo 3) y se tomaron como controles 10 sanos (grupo 4) que cumplieron con los criterios de inclusión. Se excluyeron 8 pacientes con HPTS grave, 6 por abandono del estudio (muestra pos PTX), 1 por presentar proceso infeccioso asociado a angioacceso con aislamiento de staphylococcus epidermidis durante su hospitalización y 1 a quien se difirió procedimiento ante la falta de insumos (gluconato de calcio).

De los pacientes con HPTS moderados se excluyeron 2, al no contar con muestra suficiente para la medición del calcio citosólico.

De los 22 pacientes y 10 sanos restantes, la mediana de edad para los pacientes fue de 40 años mientras que en sanos 28 años, el género masculino predominó en 10 de los pacientes con HPTS moderado, mientras que en graves y sanos 5 pacientes fueron hombres. Todos los pacientes con HPTS se encontraban en estadio G5d de KDIGO, de los pacientes con HPTS Grave 9, se encontraban en hemodiálisis (HD) y 1 en diálisis peritoneal (DP), en los moderados 7 se encontró en HD y 5 en DP, la etiología de la ERC predominante en ambos grupos fue no diabética en 20 pacientes y en solo 2 fue secundario a diabetes mellitus.

Se observó que todos los pacientes con HPTS Grave (n=10) no consumían carbonato de calcio y/o calcitriol en 4-6 meses previos a la PTX comparado con el 41.6% (n=5) de los moderados con una dosis promedio de $5.8 \text{ gr} \pm 7 \text{ DE}$ de carbonato de calcio al día y 33% (n=4) de ellos consumía calcitriol a dosis promedio de 0.25mcg/día.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas.

Sanos (n=10)	HPTSM (n=12)	HPTSG Pre PTX (n=10)	HPTSG Pos PTX (n=10)
--------------	--------------	-------------------------	-------------------------

Edad (años)	28±1	43±14	37±15	37±15
Genero (F:M)	5:5	2:10	5:5	5:5
Estadio de ERC (1,2,3,4,5)	N/A	G5d (12)	G5d (10)	G5d (10)
TSFR (HD:DP)	N/A	7:5	9:1	9:1
Etiología (DM:NO DM)	N/A	2:10	0:10	0:10
Carbonato de calcio (SI-NO)	N/A	5:7 (dosis 5.8 gr±7)	0:10	0:10
Tratamiento con calcitriol	N/A	5:7 (dosis 0.25 mcg)	0:10	0:10
Calcioantagonistas (SI-NO)	N/A	8:4*	5:5**	5:5

TSFR: Terapia de sustitutiva de la función renal, HD hemodialisis, DP dialisis peritoneal, *37.5% amlodipino, 62.5% nifedipino, **66.6% amlodipino, 33.3% nifedipino, N/A: No aplica.

A nivel de sangre periferica el estudio mostró una mediana de PTH biointacta en pacientes sanos de 26.5 (rango de 14.4 a 48.3 pg/ml) vs 290 pg/ml (rango de 250-396 pg/ml) y 1099 pg/ml (rango de 462-1164 pg/ml) en moderados y graves respectivamente, sin embargo posterior a la PTX la PTH disminuyo hasta 5.9 pg/ml (rango de 4-82 pg/ml), de igual forma el promedio de calcio sérico en sanos fue 8.2 mg/dl vs 8.0 mg/dl en moderados y 9.2 mg/dl en graves, el cual aumenta después de la cirugía a 10 mg/dl (p 0.93). En cuanto al calcio iónico los cuatro grupos se encontraron entre un rango de 0.74 a 0.98 mmol/dl, con niveles poco más altos posterior a la PTX (p 0.21) (Fig 1 y 2) Finalmente el fósforo promedio en sanos fue de 3.2 mg/dl, moderados 5.3mg/dl, graves 5.7mg/dl y posterior a procedimiento quirurgico disminuye a 2.4mg/dl.

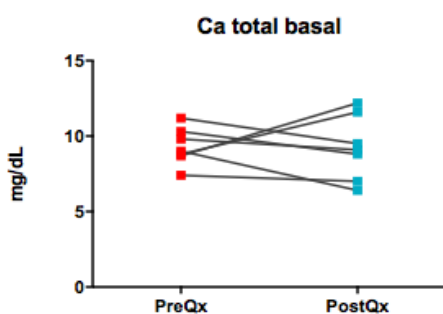


Fig. 1 Niveles de Calcio Sérico pre y pos PTX

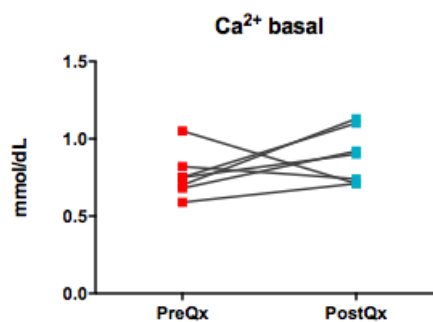


Fig 2 Niveles de calcio ionico pre y pos PTX

Tabla 2. Características Bioquímicas.

	Sanos (n=10)	HPTSM (n=12)	HPTSG Pre PTX (n=10)	HPTSG Pos PTX (n=10)	Valor de referencia
PTH (pg/ml)	26.5 (14.4-48.3)	290 (250-396)	1099 (462-1164)	5.9 (4-82)	10-65
Calcio Sérico (mg/dl)	8.2±2.9	8.0±0.8	9.2±1.0	10±2.4	8.5-10.5
Fósforo Sérico (mg/dl)	3.2±1.2	5.3±1.8	5.7±1.3	2.4±1.1	2.5-4.5
Ca++ iónico (mmol/dL)	0.74±0.17	0.87±0.11	0.78±0.16	0.98±0.27	0.8-1
Albumina (g/dl)	4.5±0.3	3.83±0.44	3.6±0.27	3.67±0.38	3.5-4

* Se muestra la mediana y entre parentesis el nivel más alto y más bajo encontrado.

En cuanto al modelo de estimulación “ex vivo” realizado en este estudio se aplicó la tinción de superficie incubando los tubos FMO y T con los anticuerpos de identificación α CD14 y α CD45, realizamos la tinción intracelular con los reactivos correspondientes, obteniendo al menos cinco mil monocitos utilizando un citómetro (basados en el estudio previo donde solo los monocitos mostraron diferencia), observando de los 4 grupos evaluados (10 sanos, 12 HPTS moderados, 10 HPTS graves pre y 10 pos PTX) mediante analisis estadístico Anova de una vía post prueba Dunn y prueba de Kruskal Wallis que el hiperparatiroidismo independientemente de la severidad no modifica la capacidad de los monocitos de sintetizar citocinas IL1b (p 0.25), IL6 (p 0.14), IL8 (p 0.67) y TNF (p 0.22) con estímulo LPS. (Fig 3)

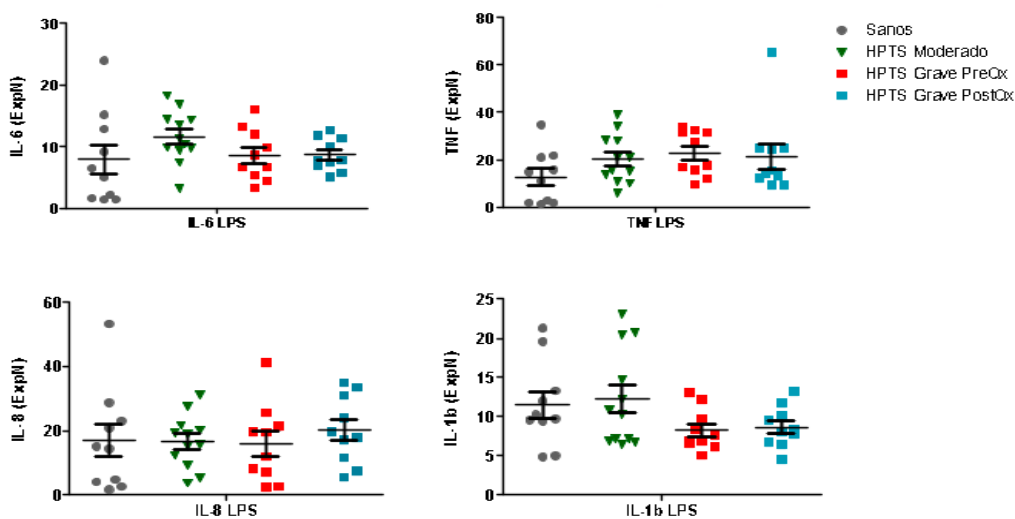


Fig 3 Comportamiento de las citocinas de monocitos en sujetos sanos, grado del HTPS y pos PTX

Incluso al analizar datos pre y pos PTX con prueba de Wilcoxon pese a la disminución significativa de la PTH (p 0.02) no encontramos correlación con la producción de IL6 (p 0.84), TNF (p 0.49), IL8 (p 0.08) y IL1b (0.62) es decir la producción parece no depender de la concentración sérica de PTH biointacta. (Fig 4)

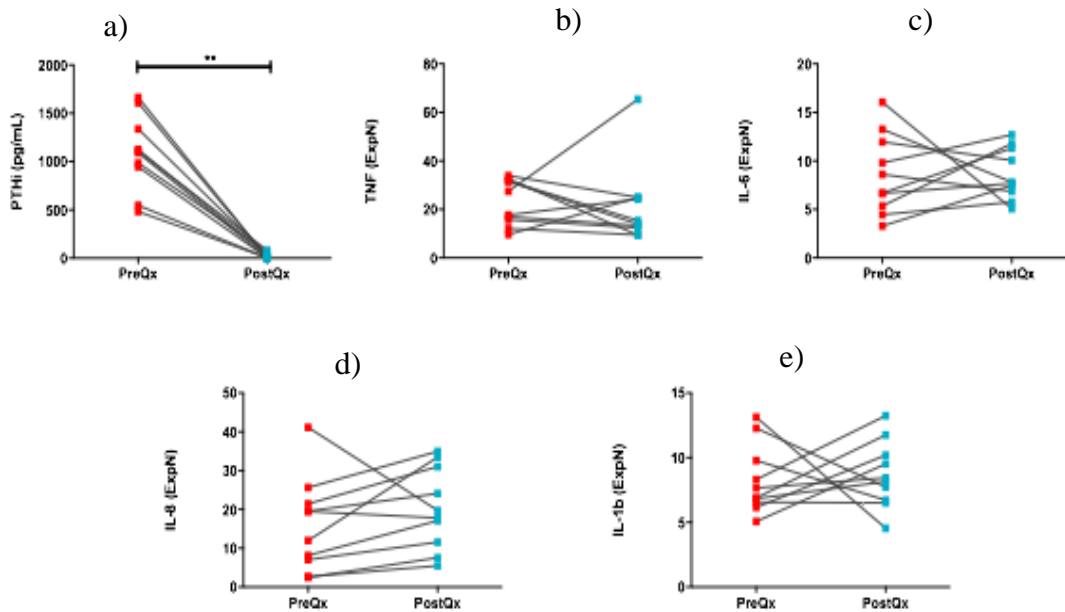


Fig 4 Comportamiento de los niveles de PTH pre y pos PTX en pacientes con HPTS grave (a), y producción de las citocinas por monocitos pre y posPTX (b-e)

Para el análisis del calcio citosólico se excluyeron 3 pacientes con HPTS grave al no contar con muestra sanguínea suficiente para el procesamiento del mismo (n=7), para la determinación se utilizó un fluorocromo sensible a Ca⁺⁺ (Fluo 4) se midió la condición basal y la estimulada con la aplicación del ionóforo A23187 en monocitos, granulocitos y linfocitos, y se calcularon las Δ MIF Fluo Ca⁺⁺, observamos pues un nivel basal de calcio citosólico mayor en monocitos en HPTS grave pre PTX vs HPTS pos PTX (p 0.046), no encontramos diferencias en los niveles de calcio citosólico máximo al agregar el ionóforo (p 0.15) ni en las Δ MIF Fluo Ca⁺⁺ (p 0.15) (Fig 5)

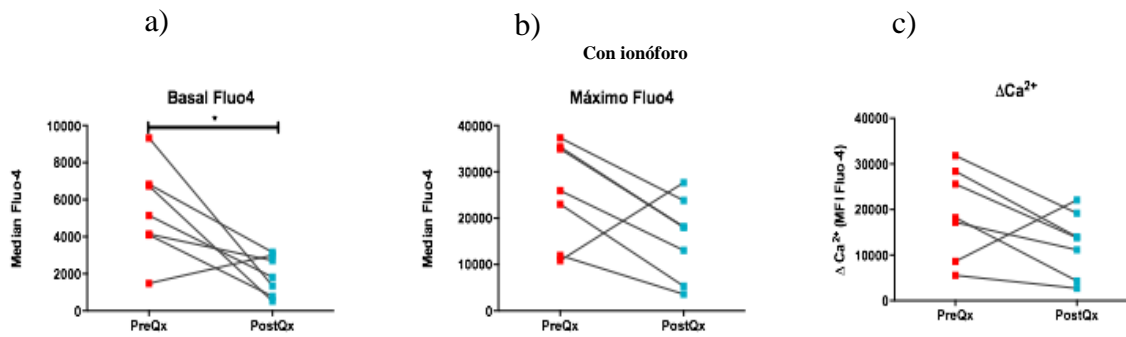


Fig 5 Comportamiento del calcio citosólico en monocitos por intensidad media de fluorescencia (Median Fluo4), basal (a), máximo (b) aplicando un ionóforo (A23187) y ΔCa^{2+} pre y pos PTX

Cuando comparamos mediante Kruskal Wallis a los 4 grupos, hubo una diferencia significativa en la concentración de calcio citosólico basal y máximo de los monocitos entre los pacientes con HPTS moderado y grave pre PTX (p 0.0007) y (p 0.0099) respectivamente. (Fig 6 y 7)

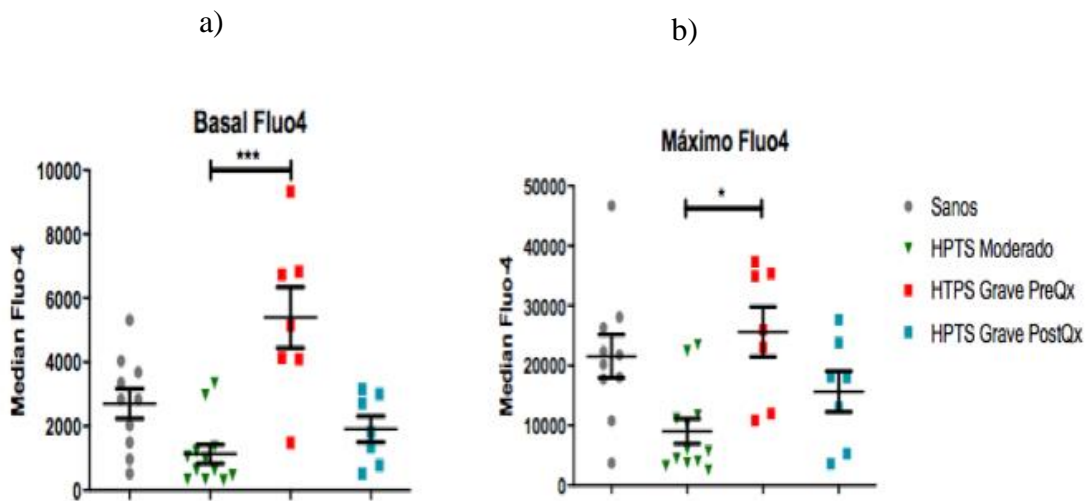


Fig 6 Concentración de Ca^{2+} citosólico en monocitos por median Fluo4, basal (a) y máximo (b) aplicando un ionóforo (A23187) intergrupos.

Sin embargo después de la estimulación de los monocitos con A23187 observamos que el MFI fluo 4 aumentaba en el grupo 1, 2, y 4, pero que el ΔCa^{2+} ante esta estimulación es significativamente menor en pacientes con HPTS pos PTX (p<0.05) (Fig 8)

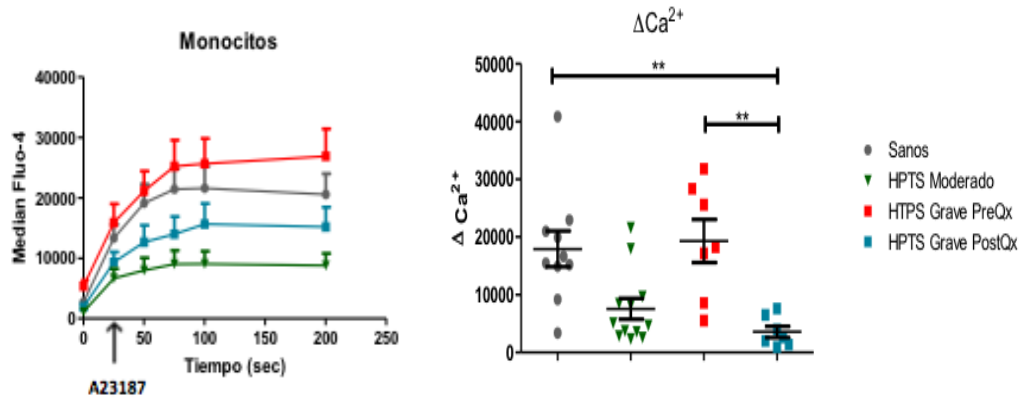


Fig 7 intensidad media de fluorescencia (Median Fluor-4) con ionóforo A23187 a través del tiempo en segundos (a), y diferencia entre ΔCa^{2+} intergrupos medida por intensidad de fluorescencia.

Llama la atención que después de la PTX los niveles citosólicos del calcio no alcanzan la concentración de un paciente sano, pese a encontrar una disminución de la concentración sérica de PTH ($p > 0.5$)

IX.- DISCUSIÓN.

Nuestro estudio “*ex vivo*” usando monocitos de 22 pacientes con HPTS, moderados (n=12), grave pre, pos PTX (n=10), y controles sanos (n=10), grupos 1,2,3, y 4 respectivamente, quienes se encontraban en diálisis crónica. Los de HPTS moderado con mediana de PTH biointacta de 290 pg/ml (R= 250-390 pg/ml) con tratamiento médico a base de quelantes calcicos y calcitriol (41.6%), mientras que los pacientes del grupo de HPTS grave sin tratamiento debido a que tenían indicación de PTX con una mediana de PTH biointacta 1099 pg/ml (R= 462-1164 pg/ml) aunado a calcificaciones vasculares, valvulares, fracturas patológicas, en algunos con hipercalcemia e hiperfosfatemia leves.

En el presente estudio en el que nos preguntamos sí **¿La concentración de Ca⁺⁺ citosólico secundario a la acción de la PTH se asocia a la producción de IL-6 en monocitos estimulados con LPS de pacientes con HPTS y pos PTX?**. Los monocitos no evidenciaron aumento de la producción de IL6 y de ningún otra citocina medida (TNF, IL1b, IL8) a la estimulación con LPS como estímulo inflamatorio, tampoco encontramos cambios en la concentración intracelular de calcio determinado por Δ Ca⁺² con Fluo4 antes y después de la cirugía.

Aunque sabemos que la IL6 producida por las células osteogénicas puede ser un mediador en la resorción osteoclástica estimulada por la PTH, en estudios experimentales en ratas se ha observado que los osteoblastos producen IL6 en respuesta a la estimulación con PTH biointacta (1-84) y hPLP sintético (1-34), esta relación es dosis dependiente, además según Lowik y cols¹⁹ ha una determinada concentración hay una disociación clara.

La interrogante, de sí el exceso de la PTH afecta la síntesis de citocinas proinflamatorias en humanos no es clara y ameritó ser investigada. Littlewood y cols realizaron un estudio *in vitro* en osteoblastos humanos con resultados contradictorios, mostraron que si bien la producción de IL 6 en osteoblastos de hueso trabecular aumenta ante el estímulo con IL1, TFN alfa y LPS, no lo hace con las hormonas osteotropicas PTH (1-34) Y 1-25 OH vitamina D. En este estudio la PTH (1-34) fue un potente estímulo en la producción de la IL 6 en células de osteosarcomas de ratas, mostrando diferencias cualitativas entre osteoblastos de humanos y roedores en la modulación y producción de IL6.²⁰

La liberación de la IL 6 estimulada por los osteoblastos puede ser la fuente predominante de la misma en suero de pacientes con HPTS, se ha informado producción en diferentes tipos de células como las células endoteliales, fibroblastos, adipocitos, islotes pancreáticos, monocitos e incluso en las propias paratiroides *in vivo* e *in vitro*,²¹⁻²³ conociendo que la principal fuente de la IL 6 en procesos inflamatorios son los monocitos y macrófagos, realizamos previamente en nuestra unidad un estudio en ocho pacientes que demostró que los niveles séricos de IL 6 no cambian en pacientes con HPTS grave pre y pos PTX, sin embargo el hallazgo más interesante fue el aumento de la producción de la IL6 pos PTX en monocitos posterior al estímulo con LPS (p 0.001), lo cual nos llevo a la hipótesis de este estudio, que el incremento de calcio citosólico es el responsable de la menor producción de IL6 en HPTS grave, sin embargo nosotros no logramos confirmar los resultados previos, es decir aún cuando categorizamos con base a niveles de PTH, no encontramos aumento de las cuatro citocinas medidas entre los grupos de estudio a pesar de usar misma técnica y brefeldina A como reactivo, se desconoce con exactitud los tiempos de toma y análisis de las muestras en el estudio previo. Kotzmann y cols²⁴ observaron niveles séricos más bajos de IL6, seis meses pos PTX, además se midió PTH intacta (1669±665 pg/ml) y nosotros biointacta (1099±388 pg/ml), el control pos PTX fue 92.5±105 vs 5.9±29 respectivamente. Por otro lado no encontramos diferencias en la concentración del calcio citosólico entre sanos y enfermos, pero si entre el calcio citosólico basal y máximo (posterior al ionóforo altamente selectivo al calcio, A23187) de los pacientes con HPTS moderado y grave pre PTX (p 0.0007) y (p 0.0099) respectivamente, esto sugiere que la concentración del Ca⁺⁺ citosólico en etapas tempranas del HPTS es menor que en sujetos sanos, lo cual puede estar influenciado por el consumo de antihipertensivos del tipo calcio antagonistas, debido a que el 66% y 42.85% de los pacientes con HPTS moderado y grave respectivamente tenían prescrito este grupo de medicamentos durante el estudio.

Varios estudios han utilizado la propiedad de estos medicamentos para mejorar los trastornos metabólicos y funcionales de las células en animales de experimentación,²⁵⁻²⁷ Walter H. y cols²⁸ apoyan el uso de verapamilo 120 mg/día en la reducción de la concentración calcio intracelular y mejora de la disfunción de las células polimorfonucleares en pacientes con HD, sin embargo la medición en estos estudios se

realizó con Fura4 mediante espectometría, nosotros hemos usado citometría y Fluo4, este último es uno de los reactivos más nuevos y menos sensibles a los rayos UV.²⁹

La tendencia del calcio citosólico pos PTX fue hacia la disminución, estadísticamente no fue significativo, creemos que puede deberse a la aplicación del iónoforo A23187 que al abrir los canales de calcio en los organelos y en membrana plasmática la menor concentración de este pudo escapar al espacio extracelular por gradiente de concentración y por tanto menor captación de calcio intracelular manifestado con menor ΔCa^{+2} , esto puede ser un hallazgo transitorio, o bien un mecanismo fisiológico con fin del mantener la homeostasis en un contexto de síndrome de hueso hambriento apoyado por las dosis altas de calcio intravenoso administradas en el posquirúrgico (promedio 18 grs ± 10 DE), por tanto este puede ser un factor que nos impida observar de forma real este hallazgo.

Nuestro estudio tiene varias ventajas, las cuales son 1) Tomamos en cuenta un grupo de pacientes moderados abarcando diferentes niveles de PTH biointacta 2) Tenemos pendiente analizar las muestras de sobrenadantes de los pacientes incluidos en este estudio para explorar una batería de marcadores inflamatorios clásicos solubles mediante un inmunoensayo por citometría de flujo. Las limitantes son 1) La muestra es pequeña, el seguimiento relativamente corto 2) Es el primer estudio en nuestro centro con uso de fluo4 y A23187 por lo que la técnica no está estandarizada y el procesamiento bioquímicos pudieran contribuir a los resultados.

Se requieren diseños de estudio más grandes quizá con un control pos quirúrgico más amplio (6 meses), será interesante medir niveles de Vitamina D, ya que se ha demostrado que los metabolitos suprimen los niveles elevados de IL 6 en estados inflamatorios.

X.-CONCLUSION

En el presente estudio no existe asociación entre la concentración de calcio citosólico y la producción de IL 6 en monocitos estimulados con LPS en pacientes con HPTS grave pre y pos PTX, sin embargo se observó menor concentración de calcio citosólico en pacientes con HPTS moderado respecto a los HPTS grave pre PTX.

X.- BIBLIOGRAFIA

1. Johnson, R., Feehally, J. & Floege, J. *Tratado de Nefrología Clínica*, 5th edn. Amolca, 2017.
2. Dusso, A.S. *et al.* p21(WAF1) and transforming growth factor-alpha mediate dietary phosphate regulation of parathyroid cell growth. *Kidney Int* **59**, 855-865 (2001).
3. Cupisti, A. & Kalantar-Zadeh, K. Management of natural and added dietary phosphorus burden in kidney disease. *Semin Nephrol* **33**, 180-190 (2013).
4. Isakova, T. *et al.* Fibroblast growth factor 23 and risks of mortality and end-stage renal disease in patients with chronic kidney disease. *JAMA* **305**, 2432-2439 (2011).
5. Puras, A.S., C. . Aspectos morfológicos del hiperparatiroidismo en pacientes con insuficiencia renal crónica. La importancia de la correlación clínico-patológica. *Rev Esp Patol* **36**, 383-388 (2003).
6. Chutia, H., Ruram, A.A., Bhattacharyya, H., Boruah, P. & Nath, C. Association of secondary hyperparathyroidism with hemoglobin level in patients with chronic kidney disease. *J Lab Physicians* **5**, 51-54 (2013).
7. Lindner, A., Charra, B., Sherrard, D.J. & Scribner, B.H. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* **290**, 697-701 (1974).
8. McCarty, M.F. Secondary hyperparathyroidism promotes the acute phase response -- a rationale for supplemental vitamin D in prevention of vascular events in the elderly. *Med Hypotheses* **64**, 1022-1026 (2005).
9. Castell, J.V. *et al.* Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. *Hepatology* **12**, 1179-1186 (1990).
10. Mitnick, M.A. *et al.* Parathyroid hormone induces hepatic production of bioactive interleukin-6 and its soluble receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E405-412 (2001).

11. Schiffli, H., Stratakis, D. & Lang, S.M. Secondary hyperparathyroidism, proinflammatory cytokines and response to epoietin in anemic maintenance dialysis patients. *Nephron* **88**, 391-392 (2001).
12. Taki, K., Takayama, F., Tsuruta, Y. & Niwa, T. Oxidative stress, advanced glycation end product, and coronary artery calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int* **70**, 218-224 (2006).
13. Tanaka, M. *et al.* Parathyroidectomy markedly reduces oxidative stress in a patient with primary hyperparathyroidism. *Ther Apher Dial* **15 Suppl 1**, 38-41 (2011).
14. Salazar, J., Gallardo, J. & Trinidad, R. La corrección de hiperparatiroidismo secundario grave mejora el estrés oxidativo, en pacientes en diálisis. Especialidad en Nefrología thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 2015.
15. Geara, A.S. *et al.* Effects of parathyroid hormone on immune function. *Clin Dev Immunol* **2010** (2010).
16. Klinger, M. *et al.* Effect of parathyroid hormone on human T cell activation. *Kidney Int* **37**, 1543-1551 (1990).
17. Martinez-Perez, C., Jimenez-Urbe, A., Ferat-Osorio, E., Arriaga-Pizano, L. & Trinidad-Ramos, P. Parathyroidectomy in Patients with Severe Secondary Hyperparathyroidism Increased IL-6 Production by Monocytes Stimulated with Endotoxin. *9th International Congress on Uremia Research and Toxicity*; 2016.
- 18.- Onyia, J. E. In vivo, human parathyroid hormone fragment (hPTH 1–34) transiently stimulates immediate early response gene expression, but not proliferation, in trabecular bone cells of young rats [Volume 17, Issue 5](#), Pages 479-484 (1995)
- 19.- Lowik, G. Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: A possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis, vol. 162, N° 3 (1989)
- 20.- Littlewood, A. J. The modulation of the expression of IL6 and its receptor in human osteoblast in vitro. The Endocrine Society. vol 129, N° 3 (1991)
- 21.- Safley S.A. Interleukin-6 production and secretion by human parathyroids. *Clin Exp Immunol*, 136:145-156, (2004)
- 22.- Grey A. A role for interleukin-6 in parathyroid hormone-induced bone resorption in vivo. The endocrine society, Vol 140, N° 10 (1999)

- 23.- Shonni J. Editorial: Cytokines in primary hyperparathyroidism-factors that matter. Journal of clinical endocrinology and metabolism, Vol 81, N° 10 (1996)
- 24.- Kotzmann, H. Effects of parathyroid hormone and serum calcium on the phenotypes and function of mononuclear cells in patients with primary hyperparathyroidism. European Journal of Clinical Investigation, 28, 353-358 (1998)
- 25.- Smogorzewski, M. Chronic parathyroid hormone excess in vivo increases resting levels of cytosolic calcium in brain synaptosomes; studies in the presence and absence of chronic renal failure. Journal American Nephrology, 1:1162-1168 (1991)
- 26.- Massry S. Sequence of cellular events in pancreatic islets leading to impaired insulin secretion in chronic kidney disease. Journal of Renal Nutrition, Vol 21, N° 1, 92-99 (2011)
- 27.- Zhenmin N. Elevated cytosolic calcium of adipocytes in chronic renal failure, kidney international, Vol 47, 1624-1629 (1995)
- 26.- Walter H. Verapamil reverses abnormal $[Ca^{+2}]_i$ and carbohydrate metabolism of PMNL of dialysis patients. Kidney international, Vol 47, 1741-1745, (1995)
- 29.- Scheppers, E. Flow cytometric calcium flux assay: Evaluation of cytoplasmic calcium kinetics in whole blood leucocytes, Journal of Immunological methods 348, 74-82 (2009)