





UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina

**COLONIZACIÓN POR *PNEUMOCYSTIS*  
*JIROVECI* EN PACIENTES CON ENFERMEDAD  
PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA**

Memoria presentada por **Laura Rivero Rivero** para optar al grado de  
Doctora en Medicina y Cirugía

Sevilla, Octubre de 2015



# **COLONIZACIÓN POR *PNEUMOCYSTIS* *JIROVECHII* EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA**

Memoria presentada por **Laura Rivero Rivero** para optar al grado de  
Doctora en Medicina y Cirugía

## **Directores**

Francisco Javier Medrano  
Ortega  
Profesor asociado de  
Medicina

Carmen de la Horra  
Padilla  
Doctora en Farmacia

**Departamento de Medicina**

**FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



A mis hijos, vuestras risas son el motor de mi vida.

A mis padres, porque siempre supieron con acierto guiarme en el camino de la vida.

A Ale por todos los días.



## **AGRADECIMIENTOS**

Un trabajo de investigación es siempre fruto de ideas, proyectos y esfuerzos previos que corresponden a otras personas.

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a mis Directores de Tesis:

A la Dra. Carmen de la Horra, debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad, paciencia y generosidad para compartir su experiencia y amplio conocimiento conmigo, no cabe duda que su participación ha enriquecido el trabajo realizado y además, ha significado la confirmación de una sincera amistad.

Al Dr. Francisco Javier Medrano Ortega por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por su rigor metodológico y constancia.

Quiero hacer extensible este agradecimiento al Dr Enrique Calderón por ofrecerme la posibilidad de haber realizado este trabajo y por su confianza puesta en mí.

A todos los miembros del Grupo de Epidemiología clínica y molecular, CIBER de Epidemiología y Salud Pública, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), por su inestimable ayuda durante todo el proceso de elaboración de la Tesis.



**COLONIZACIÓN POR *PNEUMOCYSTIS*  
*JIROVECHII* EN PACIENTES CON ENFERMEDAD  
PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA**



## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>16</b>
1. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)	
1.1. Aproximación histórica	19
1.2. Concepto	21
1.3. Etiología	22
1.4. Patogenia	25
1.4.1. Inflamación y EPOC	25
1.4.2. Infección y EPOC	33
2. Infección por <i>Pneumocystis</i>	37
2.1. Perspectiva histórica	37
2.2. Características biológicas del patógeno	41
2.3. Patogenia	43
2.4. Manifestaciones clínicas	44
2.5. Diagnóstico	45
2.5.1. Técnicas de tinción	45
2.5.2. Técnicas moleculares	45
2.6. Colonización por <i>Pneumocystis</i>	47
2.6.1. Concepto	47
2.6.2. Epidemiología	48
2.6.3. Respuesta inflamatoria	54
3. Colonización por <i>Pneumocystis</i> y EPOC	56
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>60</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>61</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>62</b>
1. Ámbito de estudio y diseño	64
1.1. Estudio transversal	64
1.2. Estudio de casos y controles	65
2. Parámetros evaluados	66
2.1. Evaluación clínico-epidemiológica	66
2.2. Evaluación microbiológica	66
3. Variables de estudio	68
4. Técnicas de laboratorio	68
4.1. Obtención y almacenamiento de las muestras	68
4.2. Extracción de ADN	69
4.3. Identificación y caracterización molecular de <i>P. jirovecii</i>	69
4.3.1. Técnicas de amplificación del ADN	69
4.3.2. Identificación del gen mt LSU rRNA	70
4.3.3. Polimorfismos del gen mt LSU rRNA	72
4.3.4. Identificación del gen dihidropteroato sintetasa (DHPS)	75
4.3.5. Mutaciones en el gen DHPS	76
4.4. Estudios inmunológicos	78
4.4.1. Detección de anticuerpos	78
4.4.2. Cuantificación de citoquinas	79
5. Recogida y análisis de datos	81
6. Aspectos éticos	81

<b>RESULTADOS</b>	<b>83</b>
1. Estudio transversal	85
1.1. Prevalencia de colonización y exposición a <i>Pneumocystis</i>	85
1.2. Características de los pacientes y su relación con la colonización	86
1.3. Caracterización molecular de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	88
1.3.1. Genotipos en la región mitocondrial mtLSUrRNA	88
1.3.2. Genotipos en el gen de DHPS	88
1.4. Estudio de la respuesta inflamatoria	91
1.4.1. Respuesta inflamatoria local	91
1.4.2. Respuesta inflamatoria sistémica	93
2. Estudio de casos y controles	95
2.1. Características de los pacientes	95
2.2. Respuesta inflamatoria sistémica	96
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>99</b>
1. Limitaciones	101
2. Prevalencia de colonización y exposición a <i>Pneumocystis</i>	104
3. Colonización por <i>Pneumocystis</i> y gravedad de la EPOC	109
4. Distribución de genotipos	111
5. Respuesta inflamatoria en pacientes colonizados	114
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>125</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>128</b>
<b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS</b>	<b>154</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>159</b>

## **INTRODUCCIÓN**



La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es un proceso patológico, que se caracteriza por una limitación permanente del flujo aéreo que no es totalmente reversible. Incluye el enfisema, un cuadro anatómicamente definido y que se caracteriza por el agrandamiento de los espacios aéreos distales a los bronquiólos terminales, con destrucción de la pared alveolar sin fibrosis manifiesta, y la bronquitis crónica, un cuadro definido clínicamente por tos productiva crónica y una afección de las vías respiratorias en la que se estrechan los bronquiólos finos.

La anomalía funcional que define a la EPOC es la disminución del flujo espiratorio, resultado de las alteraciones anatómicas de la vía respiratoria y del parénquima alveolar, que ocasionan un aumento de la resistencia al flujo aéreo y una disminución de la elasticidad pulmonar respectivamente.

Aunque las causas que desencadenan estos procesos puedan ser variables, actualmente se considera que la inflamación crónica de la pared bronquial y del parénquima pulmonar es el mecanismo fisiopatológico fundamental de la EPOC.

Por su elevada morbi-mortalidad esta enfermedad representa actualmente un problema sanitario de primer orden. Tras las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, constituye la cuarta causa de mortalidad en nuestro país en 2008, y es también causa de importante morbilidad entre la población adulta (GOLD, 2014). (GesEPOC, 2014).

*Pneumocystis jirovecii* conocido previamente como *Pneumocystis carinii sp. f. hominis*, es un hongo atípico, ubicuo, con tropismo pulmonar y gran estenoxenismo que se transmite por vía aérea, del cual existen aún muchos aspectos desconocidos sobre su epidemiología, historia natural y fisiopatología (Calderón et. al., 2002). Habitualmente se le considera un germen oportunista que causa neumonías graves en pacientes con SIDA u otras causas de inmunodepresión. Sin embargo, se han descrito casos de neumonía por *Pneumocystis* en no inmunodeprimidos (Cano et. al., 1993) y nuestro grupo pudo demostrar por primera vez la presencia de infección subclínica o colonización en el 10% de pacientes con procesos bronquiales crónicos no inmunodeprimidos (Calderón et. al., 1993).

En los últimos años, se han comunicado datos clínicos y experimentales que sugieren que *Pneumocystis* podría tener cierto papel en la fisiopatología y la progresión de la EPOC.

Las evidencias que relacionan a *Pneumocystis* y la EPOC incluyen: una elevada prevalencia de colonización por *P. jirovecii* en los pacientes con EPOC, que es independiente de la historia de tabaquismo (Calderon et. al., 1993); la observación de una elevada tasa de enfisema y colonización por *Pneumocystis* en pacientes fumadores con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Díaz et. al., 2000); similitudes entre la respuesta inflamatoria frente a la colonización por *Pneumocystis* y la EPOC; el desarrollo de obstrucción de la vía aérea y enfisema en modelos animales colonizados por *Pneumocystis* (Patiz et. al., 2003); y la similitud entre los cambios funcionales pulmonares producidos tras la neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (PCP) y la EPOC (Fleischman et. al., 1996).

A pesar de la amplia evidencia de la que disponemos sobre la EPOC, todavía no se conocen los factores determinantes para el desarrollo y la progresión de la enfermedad. *Pneumocystis jirovecii* podría ser uno de estos agentes implicados en la patogénesis de la EPOC mediante la inducción de cambios inflamatorios que contribuyeran a la progresión de la misma.

## **1. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica**

### **1.1. Aproximación histórica**

Aunque históricamente se habían utilizado los términos de bronquitis crónica o enfisema para designar una serie de procesos que se caracterizaban por tos, expectoración crónica y /o dificultad respiratoria, el primer intento de definición y caracterización de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica se remonta a 1958 (CIBA GUEST SYMPOSIUM, 1958) cuando se introduce el concepto de enfermedad pulmonar crónica no específica, dentro del cual se incluían la bronquitis crónica y la enfermedad obstructiva generalizada, la cual a su vez se desglosaba en asma y enfisema.

El término EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica) surge por primera vez en 1975, al amparo de la *American Thoracic Society* (ATS) y del *American College of Chest Physicians* (ACCP) y es enunciado como una enfermedad de etiología incierta caracterizada por enlentecimiento persistente al flujo aéreo durante la espiración forzada. Aunque con posterioridad gozó de amplia difusión la terminología introducida por Thurlbeck de “Obstrucción crónica al flujo aéreo” (OCFA), finalmente se aceptó de forma general en la comunidad científica internacional el concepto de EPOC.

La ATS define en 1987 la EPOC como “una alteración caracterizada por la disminución de los flujos aéreos espiratorios que no se modifica durante varios meses de observación y que se produce como consecuencia de alteraciones estructurales que afectan a las vías aéreas y al parénquima pulmonar, englobando bronquitis crónica, enfisema y enfermedad de las vías aéreas pequeñas”. Esta definición se ha ido reproduciendo en sucesivas normativas pero, en los últimos años, se han realizado numerosos avances en el conocimiento de la etiología y patogenia de la enfermedad y esto se refleja en las nuevas definiciones que hacen mención expresa de estos avances.

El consenso GOLD (*Initiative Global Obstructive Lung Disease*) define la EPOC como “un proceso patológico que se caracteriza por una limitación del flujo aéreo que no es completamente reversible, por lo general progresiva y relacionada con una respuesta inflamatoria pulmonar anormal a partículas o gases nocivos”. (Pawels et. al., 2001).

La definición recogida en las recomendaciones de la SEPAR (Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica), ahonda más en los aspectos etiopatogénicos mencionando de forma expresa que esta limitación al flujo aéreo aparece asociada a una reacción inflamatoria anómala frente al humo del tabaco. (Barberá et. al., 2001). La conferencia de consenso sobre EPOC celebrada en España en el 2003 reafirma en su definición los aspectos patogénicos (enfermedad inflamatoria) y etiológicos (reacción al humo del tabaco).

Si se analiza cómo han cambiado en el tiempo las diferentes definiciones expuestas se puede observar una evolución lógica que ha ido paralela al progresivo conocimiento de la enfermedad, cuya naturaleza última no está totalmente aclarada.

Así, inicialmente la definición se basaba de forma exclusiva en aspectos clínicos: tos, expectoración y disnea. Más tarde incorpora datos funcionales y de las alteraciones histológicas que los sustentan: limitación al flujo aéreo, enfermedad de la vía aérea, enfisema. Finalmente se hace mención a la etiología (humo del tabaco) y a la patogenia de la enfermedad al incluir la noción de reacción inflamatoria anómala.

## **1.2. Concepto**

De la evaluación pormenorizada de las últimas definiciones enunciadas debemos destacar varios aspectos:

- **Obstrucción:** para poder diagnosticar a un paciente de EPOC es requisito indispensable demostrar, mediante la realización de una espirometría forzada, que existe una alteración ventilatoria obstructiva, caracterizada por una reducción en el volumen espiratorio forzado en el primer segundo y en la relación de este con la capacidad vital forzada (VEF1 y VEF1/CVF respectivamente). El término EPOC no debe emplearse para definir procesos que cursan con disminución del flujo aéreo, pero que tienen una causa específica, como es el caso de la fibrosis quística, las bronquiectasias, las secuelas de tuberculosis (TBC) o la bronquiolitis obliterante.

- **Reversibilidad incompleta:** la administración de broncodilatadores no permite revertir completamente la obstrucción ni de forma inmediata ni a largo plazo. En el asma es habitual que tras un tratamiento correcto los valores de la espirometría puedan llegar a normalizarse.

- **Inflamación:** la causa de esta obstrucción es un proceso inflamatorio crónico que afecta a las vías aéreas y al parénquima pulmonar.

- **Tabaco:** el humo del tabaco es, sin duda, la causa más frecuente de la EPOC en los países industrializados, aspecto fundamental que la definición de la SEPAR recoge de forma explícita. Este hecho es tan claro que se debe poner en duda el diagnóstico de EPOC en ausencia de un antecedente como la exposición al humo del tabaco. Sólo en un pequeño porcentaje de enfermos puede aparecer la EPOC en ausencia de historia de tabaquismo como respuesta a otros tóxicos inhalados (laborales, ambientales, etc.).

En resumen, y desde un punto de vista práctico, el diagnóstico actual de EPOC se establece sobre la base del antecedente del consumo de tabaco y una sintomatología clínica (tos, expectoración, disnea) y la demostración, mediante una espirometría forzada de obstrucción al flujo aéreo. Se considera esta cuando el valor del VEF1 es inferior al 80% del valor teórico de referencia y la relación VEF1/CVF es inferior a 0,7 tras prueba broncodilatadora (Conferencia de consenso sobre EPOC 2003. Arch Bronconeumol 2003, Suppl 3:1- 47; GesEPOC. 2014; GOLD 2014).

### **1.3. Etiología**

La observación de que sólo un 20% de los fumadores desarrollarán una pérdida acelerada de la función pulmonar sugiere que existen otros factores adicionales que, combinados con el tabaquismo, hacen susceptible a un individuo de desarrollar la enfermedad. Estos factores son en algunos casos de índole exógena, como la exposición a un agente tóxico inhalado, y en otros son de tipo endógeno. Sin embargo habitualmente, éstos actuarían potenciando la acción del tabaco. Todo ello ha llevado a establecer que existe una población “susceptible” al humo del tabaco, la cual desarrolla una disminución excesiva de la función pulmonar cuando se expone al hábito de fumar. Este concepto de “susceptibilidad” a la EPOC tiene dos consecuencias: a) el hábito tabáquico es necesario pero no suficiente para causar la EPOC; b) deben existir otros factores adicionales que combinados con el tabaquismo expliquen por qué unos fumadores desarrollan la enfermedad y otros no (AGN Agustí. 2000).

#### **a) Factores de susceptibilidad exógenos**

##### **Tabaquismo**

El factor de riesgo fundamental, sin el que para algunos expertos no puede existir una EPOC, es el consumo de tabaco para el que existe una relación dosis-efecto (Antó et. al., 2001). En los estudios epidemiológicos, la mayoría de las diferencias en la prevalencia de la enfermedad se explican por el consumo de tabaco. En España y Francia los hombres padecen EPOC con más frecuencia mientras que, en los países nórdicos no existen estas diferencias e incluso la bronquitis crónica es más frecuente en las mujeres, debido a un consumo muy superior del tabaco entre las mujeres de los países del Norte de Europa (Sobradillo et. al., 2000). Recientemente se

ha demostrado que los fumadores de puros tienen un riesgo más elevado de padecer EPOC que los no fumadores y que la relación es dosis-efecto según se fumen más o menos de 5 puros al día. En este sentido el estudio IBERPOC, un análisis epidemiológico transversal y multicéntrico realizado en nuestro país, demuestra que el consumo de tabaco superior a 15 paquetes/año tiene una relación muy marcada con la existencia de EPOC. La razón de riesgo (Odd ratio) más elevada (5,4) se encuentra cuando el consumo es superior a 30 paquetes/año (Proyecto IBERPOC, 1997).

### **Tabaquismo pasivo**

Varios estudios de base poblacional han demostrado que esta exposición podría tener influencia en la prevalencia de la aparición de síntomas respiratorios (Michel et. al., 1990).

### **Nutrición y dieta**

Diversos estudios han encontrado una relación significativa entre déficit nutricional y la incidencia de EPOC. De hecho, se ha confirmado el efecto beneficioso de antioxidantes como los betacarotenos y las vitaminas C y E (Britton et. al., 1995).

### **Contaminantes atmosféricos**

Los gases derivados de cocinar en espacios cerrados, y contaminantes de origen ocupacional y químicos también se han asociado con el riesgo de desarrollar EPOC (Dennis et. al., 1996). Diversas revisiones sistemáticas han identificado a la biomasa y otros combustibles para uso en calefacción o cocina en países en vías de desarrollo como factor de riesgo de EPOC en áreas rurales (Hu G et. al., 2010).

### **Infecciones**

Se postula que agentes irritantes inhalados darían lugar a infecciones intercurrentes, con una reacción inflamatoria que sería la responsable de la destrucción acinar y de la limitación del flujo aéreo. Sin embargo, estudios prospectivos no han podido demostrar esta hipótesis y es difícil de valorar el verdadero impacto de las infecciones en la edad adulta. Entre el 20-40 % de los pacientes con EPOC en situación de estabilidad clínica presentan colonización de las vías aéreas, aparentemente en relación con el hábito tabáquico (Monsó et. al., 1999).

El papel de la colonización bacteriana en la historia natural de la enfermedad es desconocido en la actualidad (Murphy et. al., 1992). Parece que determinadas infecciones sobre todo virales (adenovirus, VRS) en los primeros años de la vida podrían condicionar la aparición de síntomas respiratorios crónicos o alteraciones en la función pulmonar que constituirían un factor de riesgo para el desarrollo de la EPOC en la edad adulta (Sheti& Murphy; 2008).

## **b) Factores de susceptibilidad endógenos**

### **Hiperreactividad bronquial**

La hiperreactividad bronquial (HRB) es la base de la teoría holandesa formulada por Orié en 1961 y Vanderlerde en 1969 (Orié N, 1961),(Van der Lende R, 1970). Estos autores postularon que el desarrollo de la obstrucción bronquial estaba relacionado estrechamente con la HRB, de forma que, cómo Barter y Campbell demostraron en 1976, una pequeña exposición al humo del tabaco puede producir una grave afectación ventilatoria cuando existe HRB (Barter et. al., 1976). Sigue existiendo controversia en la actualidad, ya que resulta muy difícil determinar si la HRB es un auténtico factor de riesgo de EPOC, o si se produce como resultado de una enfermedad respiratoria relacionada con el tabaquismo.

### **Raza y género**

A igual consumo de tabaco existe una prevalencia mayor de EPOC en sujetos de raza blanca cuando se comparan con individuos de raza negra y orientales y en hombres frente a mujeres (Davis et. al., 1989). Este último aspecto resulta controvertido a la luz de otros trabajos en los que se aprecia una elevada proporción de enfisema en mujeres jóvenes de menos de 35 años, por lo que para los autores de este estudio las mujeres podrían tener un riesgo igual o mayor al de los hombres de desarrollar una EPOC (Silverman et. al., 1998)

### **Factores genéticos y hereditarios**

La hipótesis de una predisposición genética se sustenta en la evidencia de una agregación familiar en pacientes con inicio temprano de EPOC (Silverman et. al., 1998) y en las diferencias en la prevalencia de esta enfermedad entre individuos de distintos grupos raciales.

Hasta la fecha la única anomalía genética claramente relacionada con la aparición de enfisema es el déficit de alfa-1-antitripsina. En pacientes con déficit de alfa-1-antitripsina de fenotipo PiZZ, el cual se asocia con niveles de enzima inferiores al 10% de los valores normales, se produce un desarrollo temprano de enfisema pulmonar que es acelerado por el hábito de fumar, indicando una clara predisposición genética para el desarrollo de EPOC. Sin embargo, sólo un 1% de los pacientes con EPOC tienen déficit de alfa-1-antitripsina, lo que ha llevado a buscar asociaciones con polimorfismos de otros genes que pudieran estar implicados en su fisiopatología (Barnes., 1999). Se ha observado una asociación entre el polimorfismo en el promotor del gen que codifica el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que produce un aumento en la producción de esta citoquina y un riesgo 10 veces mayor de desarrollar EPOC en una población tailandesa (Huang et. al., 1997).

Otros estudios han demostrado asociación entre una variante polimórfica de la hidrolasa epóxido microsomal, enzima implicada en el metabolismo de los epóxidos generados por el humo del tabaco, y un riesgo cinco veces mayor de desarrollar EPOC (Smith et. al., 1997).

## **1.4. Patogenia**

### **1.4.1. Inflamación y EPOC**

Existen evidencias que demuestran que las alteraciones inmunitarias e inflamatorias constituyen la base fisiopatológica para el desarrollo de muchas de las enfermedades pulmonares crónicas, como la EPOC o la fibrosis pulmonar idiopática.

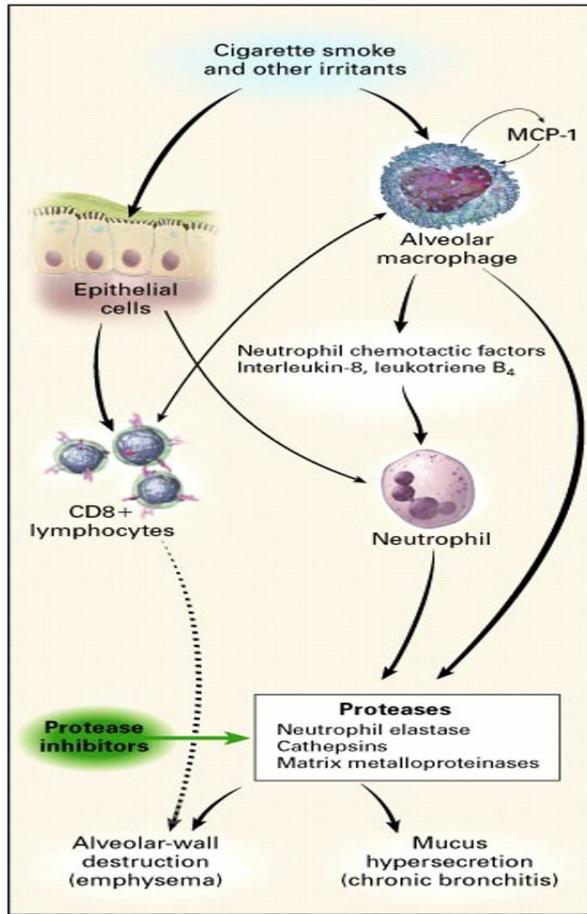
La EPOC se caracteriza por una inflamación crónica de la vía aérea, el parénquima y el lecho vascular pulmonar. Estudios histológicos muestran que el foco de la inflamación se localiza en el parénquima pulmonar y en los bronquiolos que están obstruidos por la presencia de fibrosis e infiltración por macrófagos y linfocitos, predominando los linfocitos T (LT) de fenotipo CD8 + o citotóxicos (Barnes., 2000).

En el enfisema existe destrucción de los espacios alveolares por el proceso inflamatorio, aunque hasta hace poco tiempo no ha sido aclarado el patrón celular predominante.

Tradicionalmente se ha atribuido el protagonismo al neutrófilo, que aparece a las pocas horas del consumo tabáquico y que persiste, junto con los macrófagos activados, produciendo una gran cantidad de mediadores de la inflamación, así como proteasas y oxidantes responsables de la destrucción del parénquima pulmonar. Los neutrófilos aparecen incrementados en la luz de la vía aérea y, por tanto, en el lavado broncoalveolar y esputo de pacientes fumadores con EPOC (Martin et. al., 1985). Sin embargo, estudios realizados en parénquima pulmonar demostraron que son los linfocitos T y los macrófagos los que se correlacionan con una mayor destrucción pulmonar (Filkenstein et. al., 1995).

Posteriormente se observó que la subpoblación CD8+ era la predominante, reproduciéndose este patrón celular tanto en el lecho vascular pulmonar como en las vías aéreas centrales y periféricas (Saetta et. al., 1998). Por otro lado, se identificó el papel de las células epiteliales como liberadoras de mediadores inflamatorios como la interleuquina 8 (IL-8) y el TNF alfa, posiblemente responsables del inicio de la cascada inflamatoria.

Posteriormente se propuso un modelo que trataba de integrar el papel las distintas células inflamatorias encontradas a diferentes niveles (Cosío et. al., 2002).



**Figura 1:** Modelo de interacción entre células y mediadores de EPOC

Así, como se muestra en la figura 1, el humo del tabaco daría lugar a una disrupción de la barrera epitelial con una reacción inflamatoria inicial compuesta principalmente por neutrófilos y macrófagos. Como consecuencia de ello se produciría la exposición de péptidos derivados de la matriz intersticial (elastina, colágeno, proteoglicanos) con capacidad antigénica que serían reconocidos por los linfocitos T, que son activados y de esta forma se iniciaría su proliferación. Las células T activadas pueden reclutar neutrófilos, macrófagos e incluso eosinófilos al lugar de la inflamación.

En diversos estudios se ha concluido que la acumulación de estas células inflamatorias tiende a perpetuarse e incluso amplificarse con el tiempo, aún cuando el estímulo desencadenante, el tabaco, ha sido suprimido. En este sentido cabría

hipotetizar la presencia de una infección latente como responsable del fenómeno de amplificación.

#### **a) Mecanismos de reclutamiento celular**

Es probable que el reclutamiento de células inflamatorias al pulmón responda a varias causas. En primer lugar, el humo del tabaco puede atraer células inflamatorias directamente. La liberación de mediadores proinflamatorios por estas células amplifica este fenómeno inicial. En segundo lugar, el humo del tabaco puede inducir un fenotipo proinflamatorio en las células epiteliales de las vías aéreas, que también liberarían más mediadores quimiotácticos y que a su vez atraerían más células inflamatorias. Finalmente, los fragmentos de matriz extracelular son quimiotácticos para los macrófagos y se ha hipotetizado que esto pudiera ser responsable de una inflamación crónica (Barnes., 2008). Es posible que una combinación de estos factores, junto con el papel del estrés oxidativo y la posibilidad de una infección latente, como profundizaremos más adelante, inicie una cascada inflamatoria que se auto perpetúe en el tiempo, incluso después de haber desaparecido el estímulo que la inició.

#### **b) Mediadores inflamatorios**

Los mediadores inflamatorios implicados en la EPOC están peor definidos que en el asma. El conocimiento actual sugiere que múltiples vías de inflamación pueden estar activadas por distintos mecanismos.

Así, las concentraciones de leucotrieno B<sub>4</sub>, un potente quimiotáctico de neutrófilos están aumentadas en esputo de estos pacientes (Hill et. al., 1999). Los neutrófilos se encuentran también incrementados en las glándulas bronquiales indicando que podrían tener un papel en la hipersecreción de moco observada en los pacientes con EPOC, bien por un efecto secretagogo directo, o bien por estimular la diferenciación de células epiteliales a estas glándulas (Martin et. al., 1985).

Por otra parte, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la interleuquina 8 (IL-8) también están aumentados en el esputo y lavado broncoalveolar (LBA) de los pacientes con EPOC (Keatings VM et. al., 1996).

El TNF- $\alpha$  es una potente citoquina proinflamatoria, que interacciona con dos receptores transmembrana estructuralmente semejantes pero funcionalmente distintos, TNF-R55 y TNF-R75, expresados en la superficie de células de origen epitelial y origen mieloide, respectivamente. Así, se ha comunicado la presencia de niveles elevados de sTNF-R55 en el esputo de estos pacientes con EPOC en comparación con controles sanos (Keatings et. al., 1996).

Este fenómeno ha sido considerado como un marcador del estado proinflamatorio, puesto que contribuye a la leucocitosis, con el reclutamiento de neutrófilos desde la médula ósea, e interviene en el proceso inflamatorio estimulando la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos y células endoteliales, lo que permite la adhesión de neutrófilos y eosinófilos al endotelio vascular y al epitelio respiratorio. Además el TNF- $\alpha$  también interviene estimulando la producción de otras citoquinas como IL-6 e IL-8. (O'Donnell et. al.,2006).

El macrófago parece jugar un papel fundamental, apareciendo en cantidades hasta 10 veces mayores en el pulmón del fumador, tras ser activado por el tabaco u otros irritantes. Interviene en la producción de interleuquinas proinflamatorias (TNF-alfa, IL-1), factores quimiotácticos de neutrófilos (IL-8) y sustancias que estimulan la proliferación de los fibroblastos, así como el balance en el tipo de respuesta T “helper” (colaboradora) 1 y 2 (Th1/Th2) que modula las características de la respuesta inflamatoria y el desarrollo de fibrosis. Los macrófagos junto con los neutrófilos están implicados en el daño tisular en la EPOC por la producción de proteasas que actúan en el parénquima pulmonar degradando el tejido conectivo y dando lugar al enfisema (Sethi et. al., 2012).

El papel de los LT en la EPOC no está claro, pero parece un hecho aceptado que la subpoblación predominante en la pared alveolar en el enfisema son los LT citotóxicos (CD8+). Se especula que están implicados en la destrucción del parénquima pulmonar, mediante la inducción de apoptosis o por un daño directo sobre las células epiteliales alveolares debido a la producción de sustancias líticas como perforinas y TNF- $\alpha$  ( O'Donnell et. al., 2006).

### **c) Balance proteasas- antiproteasas**

La matriz extracelular del pulmón está compuesta principalmente por colágeno tipo IV, proteoglicanos y elastina. El enfisema se produce cuando existe degradación de los componentes de esta matriz fundamentalmente de la elastina.

Como responsables de la degradación del tejido conectivo pulmonar observado en el desarrollo de enfisema se han propuesto diferentes proteasas. La elastasa, la proteasa 3, algunas proteasas séricas procedentes de neutrófilos y las catepsinas han sido objeto de estudio y se han demostrado capaces de producir enfisema en modelos animales. La elastasa de los neutrófilos es inhibida por la  $\alpha$ 1-antitripsina, lo que explica el desarrollo de enfisema en los pacientes con déficit de esta enzima. Además las proteasas séricas son potentes estimulantes de la secreción de moco, lo que podría explicar la hipersecreción mucosa observada en esta enfermedad. Su papel en el enfisema asociado al humo del tabaco está menos claro (Barnes et. al., 2003).

Por otra parte, existe cada vez más evidencia del papel de las metaloproteinasas derivadas de neutrófilos y macrófagos en la etiopatogenia del enfisema pulmonar (Shapiro et. al., 1999).

Las metaloproteinasas de la matriz (MMP) son una familia de más de 20 enzimas degradantes de la matriz extracelular derivadas de macrófagos y neutrófilos, que se piensa que son importantes para el desarrollo normal y la reparación del pulmón. Se ha encontrado la expresión anormal de estas enzimas en otros procesos destructivos como la invasión tumoral y la angiogénesis, artritis, arteriosclerosis o aneurismas arteriales, además del enfisema pulmonar.

En pacientes con enfisema existe una mayor concentración de MMP-1 (colagenasa) y MMP-9 (gelatinasa) en lavado brocoalveolar y una mayor expresión en macrófagos alveolares (Culpitt et. al., 1999). También se ha observado un incremento en la actividad de la MMP-9 y la MMP-2 en el parénquima pulmonar de pacientes con enfisema (Ohnishi et. al., 1998).

El interés en las metaloproteinasas ha aumentado desde la demostración de que la delección del gen que codifica la MMP-12 (macrófago metaloelastasa) previene el desarrollo de enfisema asociado a la exposición crónica al humo del tabaco en el ratón transgénico (Hautamaki et. al., 1997).

Churg y cols. (Churg et. al., 2003) demostraron que la inflamación producida por el humo del tabaco está mediada por la MMP-12, que actúa induciendo la liberación de TNF- $\alpha$  de los macrófagos alveolares con el subsecuente efecto de activación endotelial, atracción de neutrófilos al pulmón, y digestión de la matriz intersticial por las proteasas derivadas de neutrófilos. Estos autores sugieren que la liberación de TNF- $\alpha$  puede ser el mecanismo general por el cual el humo del tabaco produce inflamación pulmonar.

Normalmente todas las enzimas elastolíticas están contrarrestadas por antiproteasas.

La  $\alpha$ 1- antitripsina es un importante inhibidor de las proteasas séricas en el parénquima pulmonar. Las metaloproteinasas tienen tres enzimas que inhiben su efecto, llamadas inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3).

El humo del tabaco puede inducir inflamación y producir un aumento en la liberación de proteasas, que en condiciones normales en sujetos sanos son contrarrestadas por un incremento en antiproteasas suficientes para evitar el daño pulmonar. Sin embargo, en los fumadores que desarrollan una EPOC, la producción de antiproteasas puede ser inadecuada para neutralizar los efectos de las múltiples proteasas, probablemente secundario a polimorfismos genéticos que alteran la función o la producción de estas enzimas (Willemsse et. al., 2004).

#### **d) Efecto del estrés oxidativo**

El humo del tabaco es una fuente de radicales libres, calculándose una cantidad de 107 moléculas oxidantes por cada inhalación de un cigarrillo (Macnee et. al., 1999). Existe cada vez más evidencia de la implicación del estrés oxidativo en la patogenia de la EPOC (Repine et. al., 1997), aunque hasta la fecha no existe ningún sistema capaz de cuantificarlo y los datos publicados corresponden a mediciones indirectas.

Se ha demostrado un aumento de peróxido de hidrógeno en el aire exhalado de pacientes con EPOC, especialmente durante las exacerbaciones, y también un aumento de 8-isoprostanos, un marcador de oxidación lipídica en aire exhalado y orina de estos pacientes (Dekhuijzen et. al., 1996). Pero este exceso de carga

oxidante no solo proviene del tabaco sino que además los macrófagos alveolares y los neutrófilos de los fumadores liberan más radicales libres que los de los no fumadores (Rahman et. al., 1996).

Por otro lado, las frecuentes exacerbaciones que sufren los pacientes con EPOC, en gran parte secundarias a infecciones, pueden contribuir al reclutamiento y activación de células fagocíticas al pulmón y aumentar la carga oxidante.

Los mecanismos por los que los oxidantes pueden producir daño tisular en el pulmón son variados. Por un lado, pueden alterar la actividad enzimática antielastolítica de los mecanismos contrarreguladores de la degradación del pulmón como la  $\alpha$ 1- antitripsina, cuya actividad está disminuida en fumadores. Por otro lado, los oxidantes podrían ser responsables directos de dañar las vías aéreas mediante la hipersecreción mucosa, edema alveolar y broncoconstricción.

Además el humo del tabaco puede inducir la activación del factor nuclear Kappa Beta (NF- $\kappa$  $\beta$ ) y, así, activar la transcripción de mediadores de la inflamación, como el TNF-  $\alpha$  y la IL-8 (Barnes., 2000). Otros estudios demuestran una mayor expresión en epitelio bronquial de la fracción p65 del NF- $\kappa$   $\beta$  en fumadores y pacientes con EPOC, que se correlaciona con la gravedad de la obstrucción al flujo aéreo (Di Stefano et. al., 2002).

#### **e) Efectos sistémicos de la EPOC**

Evidencias recientes indican que la EPOC, además de las alteraciones pulmonares descritas que conducen a una obstrucción no reversible del flujo aéreo, se caracteriza por la presencia de diversas alteraciones sistémicas. Entre estas destacan por su relevancia clínica, la presencia de alteraciones nutricionales involucradas en la pérdida de peso que sufren estos pacientes y en la disfunción muscular esquelética que condiciona intolerancia al ejercicio así como la existencia de datos directos de inflamación sistémica (Wagner., 2008), (Verhage et. al., 2011). En este sentido la reacción inflamatoria excesiva al humo del tabaco en el pulmón puede también ser detectada a nivel de sangre periférica.

Diversos estudios indican la presencia de estrés oxidativo a nivel sistémico, concentraciones plasmáticas elevadas de diversas citoquinas como IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  y reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva (Schols et. al., 1996), así como

la presencia de marcadores de activación de diversos tipos de células inflamatorias circulantes como neutrófilos y linfocitos. Otros estudios han mostrado la presencia de niveles elevados de receptores solubles de TNF- $\alpha$  que se han asociado con el estado hipermetabólico y la pérdida de peso que presentan algún subgrupo de pacientes con EPOC (Di Francia et. al., 1994).

#### **1.4.2. Infección y EPOC**

Se ha demostrado que la presencia de microorganismos en el árbol respiratorio de pacientes con EPOC es altamente frecuente a diferencia de en los sujetos sanos. Distintos patógenos son identificados mediante cultivo y/o técnicas moleculares en esputo, cepillado bronquial y LBA en rangos del 25 al 50% en pacientes con EPOC en situación clínica estable pudiendo incrementarse esta frecuencia a medida que progresa el grado de obstrucción (Murphy et. al., 2004).

Distintas bacterias han sido relacionadas con la patogenia de la EPOC, principalmente *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Sethi., 2004) (tabla 1). Estos patógenos han sido aislados en un porcentaje variable en pacientes con EPOC en situación estable y en más del 50% de las exacerbaciones (Sethi., 2004).

La colonización bacteriana ha sido asociada con una elevación de las cifras de neutrófilos y de los niveles de IL-8 y TNF- $\alpha$  en esputo y LBA, de estos pacientes con EPOC en situación clínica estable, además de con un mayor grado de obstrucción de la vía aérea, hipersecreción de moco y presencia de enfisema (Patel et. al., 2002; Soler et. al., 1999; Patel et. al., 2004).

También algunos virus podrían estar implicados en la patogénesis de la EPOC. Retamales y cols. comunicaron la existencia de niveles elevados de la proteína E1A de adenovirus en el tejido pulmonar de fumadores con enfisema al compararlos con controles pareados por edad y hábito tabáquico sin evidencia de obstrucción de la vía aérea. Estos autores en base a la identificación de un incremento de linfocitos CD8+ y de INF- $\gamma$  en muestras pulmonares proponen que la infección latente por adenovirus en las células del epitelio respiratorio condiciona un reclutamiento excesivo de células inflamatorias, lo que supone un empeoramiento en la limitación del flujo aéreo (Retamales et. al., 2001).

Muchos otros virus parecen tener importancia en la EPOC, particularmente en exacerbaciones, la mitad de las cuales están asociadas con la detección de virus mediante PCR (Rohde et. al., 2003). Se ha demostrado que las exacerbaciones relacionadas con infecciones víricas son más severas y prolongadas que aquellas que no lo son (Papi et. al., 2006), puesto que dichas reagudizaciones están asociadas con una rápida progresión de la EPOC, los virus podrían tener un papel importante en el curso de la enfermedad.

Rhinovirus es el virus más frecuentemente identificado durante las reagudizaciones (Papi et. al., 2006). Además se ha demostrado que la inoculación de rinovirus en pacientes con EPOC incrementa los síntomas respiratorios y el grado de obstrucción (Mallia et. al., 2006).

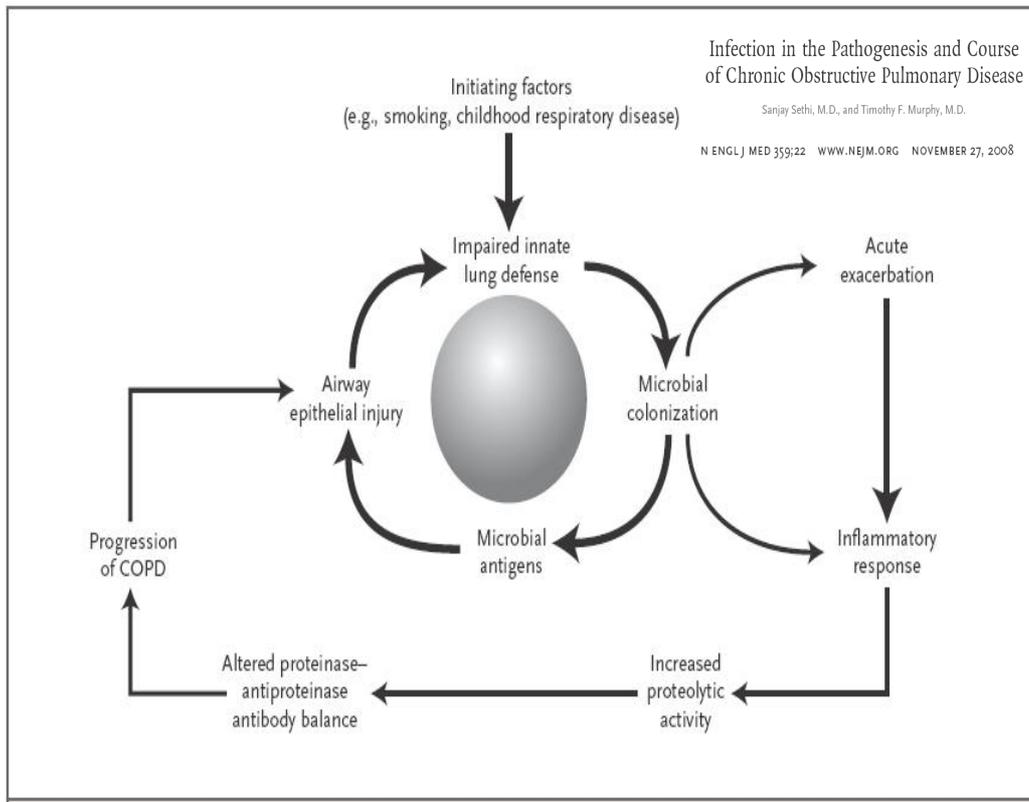
También se ha especulado sobre el posible papel del virus respiratorio sincitial en la EPOC, el cual ha sido detectado en estos pacientes tanto en situación estable como durante las reagudizaciones (Seemungal et. al., 2001). Por otra parte, los virus Influenza A y B han sido detectados mediante técnicas de PCR en aspirados nasales de estos pacientes reagudizados (Seemungal et. al., 2001). Estos virus probablemente empeoren los síntomas e intervengan en la progresión de la enfermedad a través de la inflamación pulmonar. Así se ha demostrado que el virus Influenza incrementa los niveles de IL-6 e IL-8 en las células epiteliales bronquiales (Matsukura et. al., 1996)

**Tabla 1:** Agentes infecciosos implicados en la EPOC

Microorganismos	%, Papel en exacerbación	Papel en EPOC estable
<b>Bacterias</b>		
<i>Haemophilus influenzae</i>	20-30%	importante
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10-15%	escaso
<i>Moraxella catarrhalis</i>	10-15%	escaso
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5-10%, EPOC avanzada	importante en EPOC
<i>Enterobacteriaceae</i>	?, EPOC avanzada	avanzada
<i>H. haemolyticus</i>	%, improbable	no definido
<i>H. parainfluenzae</i>	%, improbable	improbable
<i>Staphylococcus aureus</i>	poco %, improbable	improbable
<b>Bacterias atípicas</b>		
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	3-5%	%, no definido
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1-2%	improbable
<b>Virus</b>		
Rhinovirus	20-25%	improbable
Influenza	5-10%	improbable
Parainfluenza	5-10%	improbable
Virus respiratorio sincitial	5-10%	controvertido
Coronavirus	5%	improbable
Adenovirus	3-5%	no definido
Metapneumovirus	3-5%	no definido
<b>Hongos</b>		
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	%, no definido	%, no definido

El humo del tabaco es habitualmente el factor inicial que desencadena la cascada inflamatoria en la EPOC. Sin embargo, hay fumadores con distintos grados de inflamación y exfumadores que tienen una inflamación persistente e incluso progresión en el grado de obstrucción de la vía aérea. Estas observaciones sugieren que otros agentes tales como infecciones podrían actuar amplificando la respuesta inflamatoria inducida por el tabaco.

La hipótesis de que sean microorganismos los que perpetúen la inflamación y la destrucción pulmonar se ha denominado hipótesis del círculo vicioso (figura 2). (Sethi et. al., 2008).



**Figura 2:** Hipótesis del círculo vicioso

Esta teoría fue originalmente propuesta para bacterias pero puede hacerse extensible para cualquier patógeno.

En el círculo vicioso, el humo del tabaco produce daño en el aclaramiento mucociliar y una defectuosa inmunidad local, fenómeno que facilita la colonización por distintos microorganismos que podrían tener un efecto perjudicial en el pulmón, afectando a su capacidad para eliminar infecciones y estimulando una respuesta inflamatoria crónica que acelera la disfunción pulmonar con o sin la presencia del tabaco.

## 2. Infección por *Pneumocystis*

### 2.1. Perspectiva histórica

En el último siglo, la imagen de *Pneumocystis* ha sido ampliamente transformada. A principios del siglo XX este patógeno era reconocido como un enigmático parásito pulmonar cuya biología era desconocida, y a finales de siglo con la pandemia del SIDA pasó a ser uno de los agentes oportunistas más importantes en pacientes con inmunosupresión.

Fue en 1909 cuando Carlos Chagas (1879-1934) lo descubre por primera vez mientras se dedicaba al estudio de una nueva patología, la trypanosomiasis, que afectaba a los trabajadores del ferrocarril en el estado brasileño de Minas Gerais.

Chagas era capaz de reproducir la enfermedad al inocular el parásito, *Trypanosoma Cruzi*, en ratas y en cerdos de Guinea. Identificó en preparaciones histológicas del pulmón de estos animales unas formaciones quísticas multinucleadas no vistas hasta entonces, llegando a la conclusión errónea de que se trataba de distintos estados del ciclo vital del *T. cruzi*. También visualizó estas formaciones en el tejido pulmonar procedente de la autopsia del primer caso humano de trypanosomiasis americana aguda (Chagas 1911).

En 1910 Antonio Carini (1872-1950), director del Instituto Pasteur de Sao Paulo y profesor de microbiología de la Universidad de Sao Paulo, observó los mismos quistes pulmonares descritos por Chagas en el pulmón de ratas infectadas con *Trypanosomas Lewisi* (Carinii 1910).

Sin embargo, ante la sospecha de que los quistes podrían corresponderse con un microorganismo desconocido, envió muestras al Instituto Pasteur de Paris donde el matrimonio Delanöe confirmó la existencia del nuevo microorganismo descubierto por Chagas y Carini en pulmones de ratas parisinas sin trypanosomas, proponiendo la nomenclatura de *Pneumocystis carinii*, “pneumo-“ por su tropismo pulmonar, “cystis” por su forma característica y “carinii” en honor a Antonio Carinii que envió las muestras (Delanöe and Delanöe 1912).

Para demostrar que estas formaciones quísticas no pertenecían al ciclo vital del *Trypanosoma*, inocularon ratas no infectadas con los quistes y comprobaron que

no inducían la aparición de trypanosomas circulantes. Además diseñaron un experimento para estudiar la transmisión de este nuevo microorganismo en ratas infectadas y sus recién nacidos, llegando a la conclusión que se transmitían por vía aérea. Finalmente especularon sobre su relación con los coccidios.

Seguidamente a la publicación de los Delanöe en 1912, Carini (Carini y Maciel 1914) y Chagas (Chagas 1913) se retractaron públicamente de sus descubrimientos, contribuyendo a corroborar el hallazgo del matrimonio Delanöe. Después de esto abandonaron el estudio del nuevo microorganismo.

Antonio Carini después de 40 años en Brasil vuelve a Italia, donde muere a los 78 años en 1950. Ninguno de estos investigadores llegó a tener conocimiento de que su descubrimiento fuera algo más que un parásito de roedores inocuo y sin importancia.

En 1913, Aragao sugiere que *P. carinii* podría incluirse en el género *Klosiella*, aunque reconoce que tiene varias similitudes con *Cryptosporidium*, un protozoo que había sido descrito recientemente en el intestino de ratón (Aragao 1913).

La controversia sobre la clasificación taxonómica de *Pneumocystis*, especialmente sobre su naturaleza fúngica versus protozoaria, se ha mantenido en el tiempo hasta finales de los 80.

Tras su descubrimiento fue ampliamente aceptado como un protozoo, en base a los siguientes criterios: 1) similitudes en la morfología del microorganismo y en la patología causada en el huésped con los protozoos; 2) ausencia de hallazgos fenotípicos característicos de los hongos y presencia de rasgos morfológicos típicos de protozoos; 3) inefectividad de drogas antifúngicas y efectividad de drogas usadas en el tratamiento de infecciones protozoarias.

Sin embargo, la hipótesis de que se trataba de un protozoo se mantuvo hasta el año 1988, cuando aparece evidencia de su inclusión en el reino de los hongos tras el análisis del ADN. Así, se comunicaron similitudes entre ARNr de *P. carinii* y el ARNr de levaduras *Ascomycota* (Edman et. al., 1988; Stringer et. al., 1989). Del mismo modo los genes que codifican los ARNr de la subunidad mayor de los ribosomas mitocondriales (mtLSUrRNA) son homólogos a secuencias de ADN fúngico (Sinclair et. al., 1991).

Tras los Delanöe, son escasos los estudios que se diseñaron para investigar la distribución de *Pneumocystis* en el reino animal. No obstante, la presencia del microorganismo en una amplia variedad de mamíferos sin evidencia de enfermedad, hizo cuestionar su potencial patogénico, disminuyendo el interés científico y por lo tanto las publicaciones sobre ello en las dos décadas siguientes.

En 1938 Ammich (Ammich 1938) y Benecke (Benecke 1938) identifican un tipo de neumonía de etiología desconocida que afectaba a niños prematuros y malnutridos, siendo catalogada con el término de neumonía intersticial de células plasmáticas. Esta enfermedad llegó a alcanzar proporciones de epidemia en centro Europa durante la segunda guerra mundial y los años siguientes. Más de 700 casos se comunicaron en Suiza entre 1941 y 1949. Fueron dos científicos holandeses van der Meer y Brug (van der Meer & Brug, 1942) quienes relacionan esta patología con *Pneumocystis*, pero su descubrimiento no tuvo un alcance significativo.

Una década después Otto Jirovec, en Checoslovaquia, identifica *Pneumocystis* en el pulmón de 16 niños que fallecen de una misteriosa neumonitis, atribuyéndose el descubrimiento que van der Meer había realizado anteriormente (Vanek et. al., 1953).

Hasta 1956 la infección por *Pneumocystis carinii* fue considerada una enfermedad limitada a la primera infancia.

En 1956 Hamperl comunica tres casos en adultos, a los que siguieron otros 15 en la literatura hasta 1960. En las dos décadas siguientes, se pueden encontrar múltiples casos de neumonía por *Pneumocystis* en sujetos inmunodeprimidos por cualquier causa como inmunodeficiencias congénitas, tratamientos antineoplásicos, y transplantados.

Es en 1981 cuando la historia de la infección por *Pneumocystis* da un giro de 180°. Simultáneamente en California (Masur et. al., 1981) y Nueva York (Gottlieb et. al., 1981) aparecen los primeros casos de neumonía por *Pneumocystis* en pacientes jóvenes, sin ningún factor de riesgo hasta entonces asociados a la neumonía por este patógeno; todos ellos tenían en común que eran homosexuales y/o usuarios de drogas por vía parenteral y tenían alteraciones en la función y el número de linfocitos T.

Ese mismo año se definió el SIDA, marcando una nueva era en la infección por *Pneumocystis*, al convertirse en el germen oportunista más frecuente en estos pacientes.

Jaffe (Jaffe et. al., 1983) hace una revisión de los primeros 1000 casos de SIDA donde el 50% habían tenido neumonía por *P. carinii* (PcP). Hay que subrayar que el SIDA se descubrió con la observación de solo estos 15 casos comunicados por Massur y cols. y Gottlieb y cols. por lo tanto en cierto sentido *Pneumocystis* descubrió al SIDA. (Masur et. al., 1981; Gottlieb et. al., 1981)

En nuestros días el interés por *Pneumocystis* no se limita a pacientes con infección por el VIH, sino que es un patógeno oportunista frecuente en sujetos inmunodeprimidos tales como la creciente población de pacientes transplantados (Cardenal et. al., 2001) o con enfermedades autoinmunes (Ognibene et. al., 1995), así como los pacientes con neoplasias, sobre todo con trastornos linfoproliferativos (Varthalitis et. al., 1993).

Por otro lado, la infección por *Pneumocystis* no solo aparece en pacientes con algún tipo de inmunosupresión sino que también afecta a sujetos inmunocompetentes, así a principios de la década de los 90 se describieron las primeras series de casos de neumonía por este patógeno en pacientes no inmunodeprimidos (Jacobs et. al., 1991; Cano et. al., 1993).

Gracias al desarrollo de técnicas de biología molecular se identificó una gran diversidad genómica entre *Pneumocystis* aislados de diferentes especies de mamíferos, sugiriendo la existencia de una elevada especificidad de *Pneumocystis* dependiendo del huésped (Dei Cas et. al., 1998b).

Temporalmente, todos estos tipos fueron nombrados como “formas especiales” siendo la forma especial (f.s.p.) hominis (*P. carinii f.s.p. hominis*) el parásito específico humano (Anonymous 1994). Más tarde experimentos de infección cruzada confirmaron la especificidad de especies de *Pneumocystis*, llegando a la conclusión de que los humanos no contraen la enfermedad de animales infectados y, por lo tanto, la neumonía por *Pneumocystis* no es una zoonosis (Durand Joly et. al., 2002).

Frenkel renombra al microorganismo y lo denomina como especies dentro del género *Pneumocystis*. Así en el caso de *Pneumocystis* del humano (previamente llamado *P. carinii f.s.p. hominis*) propone la nomenclatura de *P. jirovecii* (Frenkel., 1976; Frenkel., 1999) en honor al parasitólogo checo Otto Jirovec que fue uno de los primeros investigadores dedicados al estudio de *Pneumocystis* en humanos, siendo aceptada posteriormente en una reunión científica sobre taxonomía y nomenclatura de *Pneumocystis* (Stringer et. al., 2001).

## **2.2. Características biológicas del patógeno**

El género *Pneumocystis* engloba a un conjunto de hongos unicelulares de baja virulencia, que se encuentran en los pulmones del ser humano y en diversos mamíferos. Inicialmente fue considerado un protozoo por sus características morfológicas y su resistencia a los antifúngicos clásicos. Sin embargo, la situación taxonómica del género se modificó al final de la década de los 80, cuando el análisis del gen del ARN ribosomal (ARNr) sugirió que dicho microorganismo estaba más relacionado con los hongos que con los protozoos.

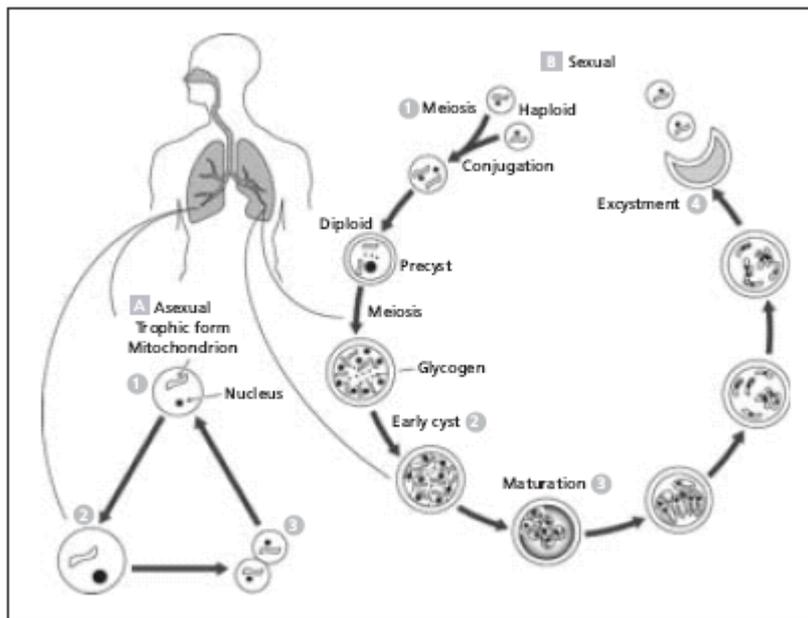
Los estudios filogenéticos han mostrado que el organismo guarda una estrecha relación con los ascomicetos como una rama basal profunda entre los arquiascomicetos. No obstante, *Pneumocystis* es un hongo poco común porque carece de ergosterol en su membrana plasmática y es insensible a los fármacos antifúngicos disponibles que actúan sobre la biosíntesis de este lípido (Gigliotti., 2006; Cushion et. al., 2006)

Las especies incluidas en el género muestran diferentes genotipos y fenotipos que se manifiestan con diferencias antigénicas y morfológicas ultraestructurales, así como por la especificidad por el huésped al que infectan. Además no sólo presentan diferencias genéticas entre los distintos huéspedes animales, sino que también existen entre las especies y/o cepas en los microorganismos del mismo huésped. Así, los modelos experimentales han demostrado que una cepa de *Pneumocystis* tomada de un mamífero determinado es incapaz de proliferar en otra especie de mamífero, por lo que es necesario individualizar las diferentes especies dentro del género *Pneumocystis*, como por ejemplo los microorganismos aislados del ser humano que reciben la denominación de *Pneumocystis jirovecii* (Durand-Joly et. al., 2002).

Los estudios sobre el ciclo vital de *Pneumocystis* se han basado en el análisis mediante microscopía óptica y electrónica de las formas observadas en los pulmones infectados. Se suelen observar tres estadios en el desarrollo del microorganismo, trofozoito, esporozoito y quiste, junto a formas intermedias adicionales (figura 3).

El trofozoito o forma trófica es pequeño (1-4µm), pleomórfico y suele aparecer en acúmulos, se identifica en la tinción de Giemsa por su núcleo rojizo y su citoplasma azul. En la fase asexual del ciclo, las formas tróficas se multiplican mediante fisión binaria. En la fase sexual, las formas tróficas haploides se conjugan para formar un cigoto diploide que se transforma en un prequiste o esporocito de 4-6 µm que tras sufrir un proceso de meiosis y mitosis se transforma en un quiste o caja de esporas que contiene ocho cuerpos intraquísticos o esporas haploides.

El quiste de 5-8 µm tiene una pared celular gruesa y se tiñe bien con tinciones como la metenammina argéntica o el azul de toluidina O.



**Figura 3:** Ciclo vital de *Pneumocystis jirovecii*

Los estudios bioquímicos y metabólicos sobre *Pneumocystis* se han visto limitados por los problemas para cultivar el microorganismo.

Se han identificado varios grupos principales de antígenos de *Pneumocystis*, el más estudiado es un fragmento denominado glicoproteína principal de superficie (MSG del inglés “major surface glycoprotein”), que es muy inmunógeno. La

capacidad de la MSG para sufrir variaciones antigénicas puede ser un mecanismo por el que *Pneumocystis* evita la respuesta inmunitaria del huésped. La función de la MSG es facilitar la interacción con las células del huésped mediante la adhesión a las proteínas de la matriz extracelular fibronectina, vitronectina, proteínas surfactantes A y D y el receptor de manosa (O'Riordan et. al., 1995).

### **2.3. Patogenia**

Tras la inhalación de *Pneumocystis*, el microorganismo escapa de las defensas de las vías respiratorias superiores y se deposita en los alvéolos.

La forma trófica se adhiere de modo preferente a los neumocitos tipo I, iniciando la infección mediante este fenómeno.

Los defectos de la inmunidad del huésped que provocan una replicación incontrolada de *Pneumocystis* y, por lo tanto, el desarrollo de enfermedad, son complejos y se conocen de forma parcial.

Desde hace mucho tiempo se considera que la alteración de la inmunidad celular es el factor predisponente más importante para el desarrollo de la enfermedad por *Pneumocystis*. La evidencia más clara sobre el papel del defecto de la inmunidad mediada por linfocitos T en el desarrollo de la neumocistosis en el ser humano procede de personas infectadas con el VIH, así es un hecho bien conocido que el riesgo de desarrollar una PcP en pacientes adultos con el VIH se incrementa en gran medida cuando el recuento de células CD4 disminuye por debajo de 200 células/ $\mu$ l. También se ha encontrado casos de PCP asociados a recuentos de CD4 bajos en pacientes oncológicos en tratamiento con agentes citotóxicos, en adultos con linfopenia idiopática CD4, y en personas sanas con defectos sutiles en los linfocitos T (Smith et. al., 1993).

Por otra parte, se han producido brotes epidémicos espontáneos de neumonía por *Pneumocystis* en animales con inmunodeficiencia celular, sobre todo en colonias de ratones con inmunodeficiencia combinada grave, así como en ratones y ratas atímicas (Walzer et. al., 1989).

Las pruebas acumuladas sugieren que las alteraciones en la inmunidad humoral tienen un papel relevante. En este sentido, también se han descrito casos de

neumonía por *Pneumocystis* en pacientes y ratones con defectos en los linfocitos B (Walzer., 1999; Walzer et. al., 1989).

Por otra parte, en modelos experimentales de neumocistosis, la administración pasiva de suero hiperinmunitario o de anticuerpos monoclonales frente a MSG y otros antígenos parece tener un efecto terapéutico beneficioso (Walzer et.al., 1989).

## **2.4. Manifestaciones clínicas**

Los principales síntomas de inicio de la neumocistosis son disnea, fiebre y tos no productiva. Existe expectoración ocasional y también puede haber dolor torácico (Thomas et. al., 2004)

Los pacientes que reciben fármacos inmunosupresores suelen desarrollar estas manifestaciones una vez que se reduce la dosis de corticoides.

La PcP en pacientes VIH suele ser una enfermedad más sutil con síntomas que duran de semanas a meses.

En la fase aguda de la enfermedad la exploración clínica muestra taquicardia y taquipnea y la auscultación pulmonar no suele ser de ayuda. La radiografía de tórax típica muestra un infiltrado intersticial difuso bilateral que se extiende desde la región perihiliar (Nyamande et. al., 2007). Los pacientes que reciben profilaxis con pentamidina inhalada tienen una mayor incidencia de infiltrados apicales y neumotórax. (Schliep et. al., 1999).

La anomalía analítica que se observa con mayor frecuencia es la hipoxemia, parámetro que determina la gravedad de la enfermedad y es empleado para valorar la progresión de la misma. Los niveles séricos de lactato deshidrogenasa (LDH), que parecen reflejar la lesión pulmonar, suelen aumentar en la PcP y disminuyen con el tratamiento eficaz (Hughes., 2004). No obstante la utilidad diagnóstica de este parámetro esta limitada por su baja especificidad (Esteves et. al., 2014)

La neumocistosis extrapulmonar puede aparecer sobre todo en pacientes con infección avanzada por el VIH que no reciben profilaxis para *Pneumocystis*. Las principales localizaciones afectadas son: ganglios linfáticos, bazo, hígado, médula ósea, aparato digestivo, ojos, tiroides, suprarrenales y riñones (Ng VL, 1997). Las manifestaciones clínicas que pueden producirse, con o sin afectación pulmonar, van

desde hallazgos casuales en la autopsia hasta una enfermedad multisistémica rápidamente progresiva.

Las manifestaciones focales de la neumocistosis extrapulmonar, son entre otras, masa tiroidea, pancitopenia, manchas retinianas tipo algodinoso o lesiones polipoideas en el conducto auditivo externo (Ng VL, 1997).

## **2.5. Diagnóstico**

Debería considerarse el diagnóstico de sospecha de PcP en cualquier paciente inmunodeprimido que presente una clínica y una radiología compatibles. Sin embargo, como estas manifestaciones no son específicas el diagnóstico de confirmación exige la demostración histopatológica o microbiológica del patógeno.

### **2.5.1. Técnicas de tinción**

Durante décadas, el diagnóstico de la infección por *P. jirovecii* se ha basado en la visualización microscópica del organismo, bien usando métodos de tinción, tales como el Azul de Toluidina, que tiñen de forma selectiva la pared de los quistes del *Pneumocystis* y los reactivos como el de Wright Giemsa, que tiñen todas las etapas del desarrollo de *Pneumocystis* así como las células infectadas (Dei-Cas et. al., 1998). Más recientemente se incorporan al diagnóstico clínico las técnicas de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos en muestras de esputo, lavado broncoalveolar (LBA) o tejido pulmonar, que son las empleadas en la actualidad por ser más sensibles y específicas que las tinciones histológicas para la detección del microorganismo.

### **2.5.2. Técnicas moleculares**

Actualmente, se considera que la amplificación del ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituye la técnica más sensible para el diagnóstico de la infección por *Pneumocystis* tanto utilizando muestras de esputo como de LBA. (de la Horra et. al., 2006; Durand-Joly et. al., 2005; Olsson et. al., 1993; Wakefield et. al., 1990).

Sin embargo, este tipo de muestras no siempre pueden obtenerse para el diagnóstico clínico, debido a la dificultad de algunos sujetos para expectorar o a la existencia de contraindicación para realizar una broncoscopia. Por este motivo, sería

interesante poder disponer de otro tipo de muestras que pudieran obtenerse de forma no invasiva y sean igualmente útiles para el diagnóstico de esta infección, pudiéndose aplicar también para estudios epidemiológicos.

Con esta finalidad se han utilizado las muestras obtenidas mediante lavado oro-faríngeo (LOF) que al tener menos carga del microorganismo que las muestras de esputo o LBA no permiten visualizar los microorganismos mediante tinciones convencionales pero sí detectar la presencia de su ADN mediante técnicas moleculares ((Durand-Joly et. al., 2005; Respaldiza et. al., 2006).

En este sentido, las muestras de LOF han demostrado su utilidad para identificar la infección por *P. jirovecii* en sujetos con infección VIH, con una sensibilidad del 78% cuando se utiliza un protocolo estándar de PCR ((Durand-Joly et. al., 2005).

Otros estudios han corroborado su utilidad para el diagnóstico de la PcP en clínica, así como para la identificación de la situación de colonización en sujetos no inmunodeprimidos (Respaldiza et. al., 2006).

La PCR se ha utilizado para amplificar diferentes genes de *P. jirovecii*, como el gen de la DHPS, el gen de la MSG, los genes ITS o el gen de la DHFR (Wakefield et. al., 1990; Durand-Joly et. al., 2005; Hugette et. al., 2008). Uno de los genes más empleados para la identificación de la presencia de *Pneumocystis* con fines diagnósticos o para estudios de epidemiología molecular es el gen mitocondrial de ADN de la subunidad mayor del ribosoma (mtLSU rRNA) de *P. jirovecii*, que está relacionado con funciones metabólicas básicas y presenta un alto grado de conservación genética. Además se trata de un gen multicopia lo que facilita su amplificación aún en situaciones de baja carga del microorganismo.

La técnica de PCR nested para el gen mtLSU rRNA ha demostrado tener una alta sensibilidad, de más del 95%, y una buena especificidad, cercana al 88%, para detectar la presencia de colonización por *P. jirovecii* en pacientes no inmunodeprimidos utilizando muestras de LOF (Morris et. al., 2008b; de la Horra et. al., 2006). De hecho, esta técnica se ha propuesto como método de referencia para el estudio de la infección por este hongo. En esta región se han identificado seis polimorfismos determinados por cambios en los nucleótidos 85 y 248 del gen mt LSU

rRNA, en base a dichas modificaciones se han denominado en la literatura como Genotipo 1 (85C/248C), Genotipo 2 (85T/248C), genotipo 3 (85T/248C), genotipo 4 (85C/248T), (85A/248T), (85T/248T). La identificación de estos polimorfismos se puede determinar mediante secuenciación directa del fragmento obtenido (Montes Cano et. al., 2004).

Otro de los genes de *P. jirovecii* más ampliamente estudiado es el gen que codifica la síntesis de la enzima dihidropteroato-sintasa (DHPS), un gen unicopia, en el cual mutaciones en el aminoácido 55 y 57 han demostrado estar asociadas a la resistencia al cotrimoxazol (Thomas et. al., 1997, Huang et. al., 2004). En este gen se han determinado cuatro genotipos y se puede tipificar con un análisis de los polimorfismos mediante restricción con enzimas específicas que permiten identificar las diferentes mutaciones puntuales descritas en la secuencia (Calderón et. al., 2004).

## **2.6. Colonización por *Pneumocystis***

### **2.6.1. Concepto**

El desarrollo de técnicas diagnósticas altamente sensibles, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tipo nested, ha permitido la detección de niveles muy bajos de *Pneumocystis*, que exceden el límite de resolución de las técnicas inmunohistoquímicas convencionales, en muestras respiratorias (lavado broncoalveolar, esputo inducido y enjuague orofaríngeo) de individuos en los que no se sospechaba infección.

Sería en 1990 cuando Wakefield y colaboradores describen por primera vez una técnica de PCR que permite la detección de ADN de *P. jirovecii* (Wakefield et. al., 1990). Desde entonces han surgido nuevos términos como portador, colonización o infección asintomática para hacer referencia a la identificación de *Pneumocystis* en sujetos sin clínica de neumonía.

Tras su descripción inicial en 1996 (Calderón et. al., 1996) esta situación de colonización o infección subclínica se ha observado en diversas poblaciones de individuos inmunocompetentes, tales como, mujeres embarazadas (Vargas et. al., 2003) o pacientes con patología pulmonar crónica (Sing et. al., 1999).

También se ha identificado la existencia de colonización por *Pneumocystis* en sujetos con algún grado de inmunosupresión como pacientes con infección por el VIH, neoplásicos, en tratamiento con inmunosupresores o con patologías del tejido conectivo (Morris et. al., 2008b; Krajicek et. al.,2009).

La significación clínica de la colonización por *Pneumocystis* no está aún bien definida pero es importante por varias razones. Por un lado, los individuos colonizados pueden estar en riesgo de desarrollar una neumonía o pueden convertirse en fuente de infección para otros sujetos susceptibles. Por otro, en los pacientes que han recibido durante un periodo prolongado de tiempo profilaxis frente a *Pneumocystis*, la colonización podría permitir la selección de mutaciones asociadas a resistencia al fármaco. Además, la presencia de *Pneumocystis* en los pulmones, aunque sea a bajos niveles, puede estimular la respuesta inflamatoria del huésped y de esta manera podría tener un importante papel fisiopatológico en el daño pulmonar y en la progresión de determinadas patologías como la EPOC ( Morris et. al., 2008b).

## **2.6.2. Epidemiología**

### **a) *Pneumocystis spp.* en no humanos**

La colonización por *Pneumocystis* está bien documentada en muchas especies de animales mamíferos. Así, ha sido ampliamente reconocida la alta prevalencia de colonización por *Pneumocystis* en ratas adultas inmunocompetentes (98%) (Icenhour et. al., 2001) demostrando que hasta el 80% eran portadoras de *Pneumocystis* en la cavidad oral en las primeras dos horas tras su nacimiento, aumentando la prevalencia hasta el 97% después de 24 horas, y alcanzando el 100% a las 48 horas.

También se ha comunicado el estado de portador de *Pneumocystis* en primates. En un trabajo en el que se evaluaron mediante *nested* PCR muestras de secreciones nasales de un grupo de macacos salvajes inmunocompetentes, se determinó un rango de prevalencia de colonización por *Pneumocystis* que osciló entre el 11% y el 100%, dependiendo del mes de edad en el que se realizaba el análisis (Demanche et. al., 2003). En modelos experimentales con primates inmunosuprimidos también se alcanzó el estado de portador tras la adquisición de la infección de forma natural o con inoculación intrabronquial, llegando a persistir por más de 40 semanas sin desarrollar una PCP. (Board et. al., 2003).

## **b) Población infantil**

La exposición primaria a *P jirovecii* es común en niños pequeños como se demuestra por el incremento de los títulos de anticuerpos frente a *Pneumocystis* durante los primeros años de vida (Wakefield et. al., 1990; Vargas et. al., 2001). En un estudio de nuestro grupo en el se analizaron 233 niños se estimó una seroprevalencia del 73%, evidenciándose además un incremento de esta en relación con la edad, desde un 52% a los 6 años hasta un 66% a los 10 y un 80% a los 13 años (Respaldiza et. al., 2004). En niños chilenos, el rango de seroconversión a los 20 meses de edad alcanzó el 85% (Vargas et. al., 2001).

La colonización por *Pneumocystis* en niños ha sido relacionada con algunas entidades clínicas como la bronquiolitis y la muerte súbita del lactante (Totet et. al., 2003; Vargas et. al., 1999).

Vargas y cols. analizaron muestras de aspirado nasofaríngeo en niños inmunocompetentes con infección de las vías respiratorias encontrando un 32% de portadores del patógeno, de ellos un 13% sufrieron episodios de apnea, que no existieron en ninguno de los no portadores. (Vargas et. al., 2001).

Nevez y cols. comunicaron una prevalencia de colonización del 24% en niños con bronquiolitis, estos hallazgos han sido corroborados por otros autores que al estudiar muestras de la población pediátrica inmunocompetente con infección respiratoria aguda o patología pulmonar crónica encontraron rangos similares de prevalencia (14%-25%) (Kasolo et. al., 2002; Larsen et. al., 2007).

Los estudios realizados en series de necropsias han tenido un papel importante en el conocimiento de la colonización por *Pneumocystis*, Vargas y cols. analizaron mediante técnicas inmunohistoquímicas tejido pulmonar procedente de autopsias de niños que murieron en sus casas y en el hospital encontrando que el 3% de todas las muestras eran positivas para *Pneumocystis*. De los niños que fallecían en su domicilio por el síndrome de la muerte súbita del lactante el 25% eran portadores de *Pneumocystis* frente a sólo el 2.9% de los niños que morían en el hospital por otras causas (Vargas et. al., 1999).

Posteriormente, Morgan y cols. obtuvieron tejido pulmonar de niños que fallecieron por muerte súbita encontrando quistes de *Pneumocystis* por microscopía

en un 14% de ellos. (Morgan et. al., 2001), Vargas y cols., analizando muestras pulmonares de autopsias mediante nested PCR comunicaron una prevalencia de colonización del 52% en niños muertos en la comunidad frente a un 20% en niños muertos en el hospital (Vargas et. al., 2005).

La prevalencia se eleva hasta un 100% en un cuarto estudio en el que se evaluaron también por PCR muestras de niños fallecidos por muerte súbita u otras causas. Esta alta prevalencia podría deberse a una mayor sensibilidad en la técnica de PCR, variaciones geográficas en la colonización por *Pneumocystis*; o diferencias en los sujetos estudiados (Beard et. al., 2005).

Por otra parte, no todas las observaciones publicadas son concordantes, así, un estudio posterior sugiere que no existe una causalidad directa entre el síndrome de muerte súbita del lactante y la colonización por *Pneumocystis* ya que encuentran una proporción de niños colonizados, determinada mediante microscopia, similar entre los niños que mueren por síndrome de la muerte súbita y por otras causas (Vargas et. al., 2007).

### **c) Adultos sanos inmunocompetentes**

La prevalencia en adultos sanos (aquellos sin causa de inmunosupresión y sin patología pulmonar) es diferente en los distintos estudios publicados.

En estudios iniciales los hallazgos orientan a una ausencia de colonización, así en un trabajo de Peters y cols. en el que se analizaron muestras de tejido pulmonar de autopsia no se encontró ADN de *Pneumocystis* en ninguna de ellas (Peters et. al., 1992). Tampoco Wakefield y cols. detectaron *Pneumocystis* en el lavado broncoalveolar (LBA) de 10 sujetos sanos (Wakefield et. al., 1990). Otros estudios en los que se analizó mediante *nested* PCR muestras de enjuagues orales, esputos inducidos o aspirados nasales de adultos voluntarios tampoco encontraron evidencia de colonización por el patógeno (Leigh et. al., 1993; Vargas et. al., 2003; Nevez et. al., 2006).

Sin embargo, existen otros estudios en los que sí se identifica la colonización por *Pneumocystis* en sujetos sanos. En un amplio análisis mediante *nested* PCR de muestras de LBA de 169 adultos inmunocompetentes encontraron que un 20% estaban colonizados por *Pneumocystis* (Nevez et. al., 1997). De la misma manera, en

otro estudio se ha demostrado la presencia de ADN de *Pneumocystis jirovecii* en un 20% de las muestras de enjuagues orofaríngeos de un grupo de 50 adultos sanos en el que se incluían trabajadores administrativos del hospital, los cuales a pesar de no tener un contacto directo con pacientes con PCP, podían tener una hipotética mayor exposición al patógeno que la mayoría de los individuos sanos de la comunidad. (Medrano et. al., 2005).

Nuevamente las discrepancias entre los hallazgos de los distintos estudios pueden ser explicadas por la variabilidad ocupacional y geográfica de los sujetos, sus características y la diferente sensibilidad de las técnicas diagnósticas utilizadas.

### **c) Adultos con infección VIH**

En contraste con lo comunicado en adultos sanos, actualmente está ampliamente aceptado que la colonización por *Pneumocystis* claramente afecta a los pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

La prevalencia depende de la población específica analizada. En un estudio de pacientes con infección por VIH, hospitalizados por neumonía, en los que se había descartado la existencia de una PCP, analizando mediante *nested* PCR muestras de esputo inducido y de LBA se encontró que el 69% de los sujetos estaban colonizados por *Pneumocystis* (Huang et. al., 2003).

En otro trabajo en muestras de tejido pulmonar de autopsias de pacientes VIH positivos fallecidos por causas diferentes a la PCP, se comunicó una prevalencia de colonización del 46% (Morris et. al., 2004). Así mismo, en otro estudio hallaron que un tercio de los pacientes VIH positivos, asintomáticos que recibían profilaxis anti PCP estaban colonizados, a pesar de que el estudio de muestras de esputo por técnicas convencionales de microscopía había sido negativo para *Pneumocystis* (Rabodonirina et. al., 1997).

Los factores que pueden contribuir a estas variaciones en la prevalencia de colonización incluyen diferencias en las características de las distintas poblaciones analizadas, en los métodos utilizados para la obtención de muestras respiratorias y en la sensibilidad de las técnicas utilizadas para el diagnóstico de la infección en cada estudio.

En cuanto a los factores relacionados con el riesgo de colonización en estos pacientes, se ha publicado que la historia previa de PcP, el uso de profilaxis frente a la PcP o la toma de fármacos antirretrovirales no parecen estar asociados con la colonización (Huang et. al., 2003; Morris et. al., 2004).

En lo referente a la relación entre el riesgo de colonización y el recuento de células CD4+ hay estudios con hallazgos controvertidos. Por un lado Leight y cols. comunicaron que existe un mayor riesgo de colonización por *Pneumocystis* a medida que descenden los CD4+, encontrando una prevalencia del 10% en sujetos con >400 CD4+/ $\mu$ l, que alcanza hasta el 40% en sujetos con <60 células/ $\mu$ l( p=0.03) (Leight et. al.,1993). Sin embargo en un estudio posterior no se observó asociación entre el número de células CD4+ y el riesgo de colonización por *Pneumocystis* (Huang et. al., 2003)

Otros factores que podrían relacionarse con la colonización por el patógeno en este subgrupo de pacientes, son el hábito tabáquico y el lugar de residencia. Así, en un estudio multicéntrico de una cohorte de pacientes con SIDA se encontró que los fumadores tenían mayor riesgo de colonización que los que no lo eran (odds ratio[OR],2.9; p=.02) y los residentes en Los Angeles tenían menor riesgo de colonización que los vivían en otros lugares (OR,0.14; p=0,002) (Morris et. al., 2004).

#### **d) Adultos inmunodeprimidos sin infección por VIH**

La colonización por *Pneumocystis jirovecii* también se ha descrito en pacientes inmunosuprimidos sin infección por VIH, comunicándose una prevalencia de colonización del 16% en pacientes con mieloma múltiple, sarcoidosis, leucemia linfática crónica y diabetes mellitus (Mekinian et. al., 2011; Vidal et. al., 2006). Al analizar la inmunidad celular en estos pacientes hasta un 30% de ellos estaban colonizados cuando su recuento de CD4+ era <400 células/ $\mu$ l. (Nevez et. al., 1999).

Por otra parte, el uso de corticoides parece asociarse a un mayor riesgo de colonización por *Pneumocystis*. En un estudio de 93 sujetos en los que se obtuvieron muestras de LBA se detectó ADN de *Pneumocystis* en un 44% de los mismos que estaban siendo tratados con metilprednisolona a dosis >20mg/día frente al 12% observado en los pacientes no tratados con corticoides (OR, 5.9; p=.004) (Maskell et.

al., 2003). Estos hallazgos fueron corroborados por Helweg-Larsen analizando muestras de 80 pacientes con neumonías bacterianas, donde el 75% de los pacientes colonizados por *Pneumocystis* habían recibido tratamiento corticoideo frente al 13% de los no colonizados ( $p=0,001$ ) (Helweg-Larsen et. al., 2002).

Las alteraciones inmunitarias asociadas con el embarazo también se han relacionado con un aumento del riesgo de colonización. En un estudio prospectivo de 33 mujeres asintomáticas durante su tercer trimestre de gestación, el 15 % estaban colonizadas por *Pneumocystis*, al aislar el ADN del patógeno en sus secreciones nasales, frente a ninguna de las 28 mujeres controles no embarazadas que se analizaron ( $p= 0,04$ ) (Vargas et. al., 2003).

#### **e) Adultos con enfermedades respiratorias**

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que la colonización por *Pneumocystis jirovecii* es una situación relativamente frecuente en pacientes con distintas patologías pulmonares. Probst y cols. analizaron 141 pacientes con enfermedades respiratorias como bronquitis crónica, fibrosis quística y cáncer de pulmón, encontrando globalmente que más del 21% de los pacientes estaban colonizados (Probst et. al., 2000; Gutierrez et. al., 2011)

En otros estudios se han comunicado prevalencias de colonización en pacientes con patología pulmonar aguda o crónica desde el 2.6% al 35% (Sing et. al., 1999; Visconti et. al., 2000; Matos et. al., 2003).

En pacientes con enfermedad pulmonar intersticial la prevalencia de colonización encontrada en nuestro entorno es del 34% (Vidal et. al., 2006), con una asociación clara con el tabaquismo (OR 3,3,  $p=0,02$ ). En este subgrupo de población otros estudios han documentado tasas de prevalencia que oscilan entre el 7,4% y el 22% (Sing et. al., 2001; Respaldiza et. al., 2005).

Finalmente, otra interesante asociación ha sido la observada con algunas de las formas del cáncer de pulmón. De la Horra y cols. encontraron que los 10 pacientes estudiados con cáncer de células pequeñas de pulmón eran positivos para el ADN del patógeno al analizar muestras de tejido pulmonar, frente a sólo 2 pacientes de los 10 analizados que no tenían cáncer ni patología pulmonar ( $p<0.001$ ) (de la Horra et. al., 2004).

### 2.6.3. Respuesta inflamatoria

Para controlar la PcP es necesario el desarrollo de una respuesta inflamatoria efectiva que a la vez es susceptible de producir un daño pulmonar en huésped. Así, la neumonía por *Pneumocystis* (PcP) induce una respuesta inflamatoria pulmonar caracterizada por un incremento de neutrófilos y linfocitos principalmente CD8+ y una elevada producción de citoquinas proinflamatorias como IL-8, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  que puede producir daño alveolar difuso y conducir al desarrollo de insuficiencia respiratoria. (Thomas et. al., 2004)

La respuesta inmune frente a *Pneumocystis* incluye complejas interacciones entre linfocitos CD4+, macrófagos alveolares y neutrófilos, además de mediadores solubles que intervienen en el aclaramiento de la infección. En particular la actividad de los CD4+ es esencial en la defensa del huésped frente a *Pneumocystis* tanto en animales como en humanos, mediante el reclutamiento y la activación de otros mediadores celulares como los monocitos y macrófagos.

Los mecanismos mediante los cuales los linfocitos CD4+ intervienen ha comenzado a estudiarse en los últimos años. Actualmente se sabe que tanto el TNF- $\alpha$  derivado de los macrófagos como la IL-1 son necesarios para iniciar la respuesta pulmonar a la infección por *Pneumocystis* mediada por CD4+. Estos proliferan en respuesta a los antígenos de *Pneumocystis* generando citoquinas mediadoras como la linfotactina y el INF- $\gamma$ . La primera es una quimoquina que actúa como atrayente para el reclutamiento de otros linfocitos en la PcP. El INF- $\gamma$  activa la producción por parte de los macrófagos de TNF- $\alpha$  y superóxidos implicados en la defensa del huésped frente a *Pneumocystis* (Wright et. al., 1999).

Aunque los linfocitos T son esenciales en el aclaramiento de la infección, existen datos que sugieren que la respuesta celular puede resultar en un daño pulmonar evidente durante la PcP. Los ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) infectados con *Pneumocystis*, tienen una función pulmonar normal a pesar de sufrir una infección activa hasta los estadios finales de la enfermedad. Sin embargo, cuando el sistema inmune de estos animales se reconstituye ocurre una intensa respuesta inflamatoria mediada por células T con el resultado de un déficit en el intercambio gaseoso (Wright et. al., 1999).

La infección por *Pneumocystis* también condiciona una marcada acumulación de linfocitos T CD8+ en el pulmón. Datos experimentales hacen referencia a que la respuesta CD8+ más concretamente el fenotipo Tc1, es crítica para el aclaramiento de algunos hongos, incluido *Pneumocystis*, particularmente en el contexto de situaciones de déficit o disfunción de células T CD4+. En las que también son capaces de inducir una respuesta inflamatoria dañina. Así, los linfocitos CD8+ afectan a la función del surfactante pulmonar y exacerban la producción de TNF- $\alpha$  (Steele et. al., 2002).

Por otra parte, los macrófagos alveolares representan las principales células fagocíticas del tracto respiratorio inferior, responsables del atrapamiento y degradación de los microorganismos en el pulmón.

Los mecanismos precisos por los cuales los macrófagos del huésped reconocen e internalizan al patógeno han sido ampliamente investigados. Una compleja variedad de receptores median estas interacciones. Así, en la ausencia de opsoninas en el fluido epitelial, la unión del *Pneumocystis* al macrófago alveolar esta mediada por los receptores manosa de los macrófagos, moléculas de reconocimiento que representan un importante mecanismo de aclaramiento innato en el huésped inmunocompetente. Una vez fagocitado el patógeno es incorporado a los fagolisosomas y degradado. En respuesta el macrófago produce una gran variedad de citoquinas proinflamatorias, quimoquinas y metabolitos ecosanoides que aunque participan en la erradicación de *Pneumocystis* también pueden producir daño en el tejido pulmonar del huésped (Kolls et. al., 1993).

Hasta la fecha, la respuesta inmune en humanos que supone la colonización por *Pneumocystis* ha sido mínimamente estudiada y los datos que disponemos en este sentido corresponden a modelos experimentales.

Así, en un modelo animal de macaco rhesus colonizado se ha identificado una cascada de infiltración celular y mediadores relacionados que es similar a la que se produce en la PcP. Boards y colaboradores analizaron la respuesta inmune a la colonización por *Pneumocystis* en un modelo animal de SIDA en el que monos infectados con el SIV (virus de la inmunodeficiencia simia) fueron inoculados con *Pneumocystis* (Board et. al., 2003). Algunos animales desarrollaron una neumonía aguda mientras que otros permanecieron en un estado de colonización. El periodo inicial tras la inoculación estaba marcado por un aumento de linfocitos CD8+ y de

neutrófilos, fenómeno observado tanto en los animales que desarrollaban neumonía como en aquellos que solo permanecían colonizados. Esta infiltración por linfocitos CD8+ y neutrófilos persistía a lo largo del curso de la infección aún en los animales que no desarrollaban PCP. Los niveles de TNF- $\alpha$ ; INF- $\gamma$  e IL-8 también permanecían elevados en muestras de LBA durante la colonización.

La intensidad y la persistencia de la respuesta inflamatoria observada en este modelo sugiere la posibilidad de que el daño pulmonar inducido por *Pneumocystis* es consecuencia de la colonización. Dicha inflamación podría tener un papel causal o potenciador de la progresión de patologías pulmonares en las que la colonización por *Pneumocystis* es un fenómeno frecuente.

La respuesta inflamatoria sistémica a la colonización por *Pneumocystis* ha sido evaluada parcialmente en humanos. Así, en un estudio llevado a cabo por nuestro grupo, donde se incluyeron pacientes no inmunodeprimidos con EPOC mostró que aquellos pacientes colonizados tenían mayores niveles de linfocitos totales y CD4+ en sangre periférica que aquellos no colonizados, lo cual podría estar en relación con la progresión de la enfermedad y las exacerbaciones de la misma (Varela JM, 2003).

La colonización por *Pneumocystis* también podría contribuir al desarrollo de enfisema mediante la estimulación de proteasas. Por otra parte, se ha publicado que en el pulmón de pacientes con PCP existe una actividad proteolítica aumentada tanto en las proteasas derivadas del huésped (MMP-2, MMP-9), como en las del propio patógeno (Qu et. al., 2000). En este sentido, se ha demostrado en modelos experimentales que el *Pneumocystis* de la rata posee actividad proteasa y elastasa que contribuye a la degradación de la barrera alveolo-capilar. (Atzori et. al., 1999).

### **3. Colonización por *Pneumocystis* y EPOC**

De especial relevancia es la asociación entre la colonización por *Pneumocystis jirovecii* y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

En el primer estudio epidemiológico en este sentido, usando técnicas de inmunofluorescencia para detección de anticuerpos monoclonales como herramienta de diagnóstico, fue posible analizar una población de bronquíticos crónicos en el Sur

de España donde se comunicó un 10% de portadores de *Pneumocystis* sin datos de inmunosupresión ni neumonía (Calderón et. al., 1996).

Más tarde se estudiaron 37 pacientes con bronquitis crónica, mediante nested PCR, encontrando que el 41 % de ellos estaban colonizados por *Pneumocystis* (Calderón et. al., 2004).

En otro estudio realizado en pacientes con varias patologías pulmonares la mayor prevalencia de colonización se alcanzó en los pacientes con EPOC (41%) (Probst et. al., 2000).

Morris y cols. evaluaron la prevalencia de colonización en pacientes sometidos a trasplante pulmonar por EPOC severa u otras patologías pulmonares terminales, analizando mediante PCR muestras del tejido pulmonar nativo, encontrando que el 37% de aquellos pacientes con EPOC severa estaban colonizados comparados con el 9% de los pacientes con otras patologías pulmonares y con el 5.3% de los pacientes con grados menos severos de la EPOC, según la clasificación de la *Global initiative for chronic obstructive lung disease* (GOLD) (Morris et. al., 2004). En el análisis multivariante el diagnóstico de EPOC fue el único predictor de colonización (OR, 7.3;  $p < 0.001$ ), y otras características clínicas como la edad, el uso de corticoides orales y la toma de trimetropin sulfametoxazol no estuvieron relacionados con el riesgo de colonización, hallazgos que sugieren que la colonización es un fenómeno específicamente relacionado con la enfermedad.

Por otra parte, existen algunas evidencias que apoyan la hipótesis de que la colonización por *Pneumocystis* podría estar relacionada con el desarrollo y la progresión de la EPOC, como el hallazgo de una correlación entre la prevalencia de colonización y el grado de obstrucción de la vía aérea que es independiente de la historia tabáquica. En este sentido, Morris y cols. analizaron muestras de tejido pulmonar de pacientes con distinto grado de severidad de la enfermedad, según la clasificación de la GOLD, pero que tenían similar historia de hábito tabáquico. Los colonizados tenían un volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF1) significativamente menor, y la colonización era más común a medida que se incrementaba la gravedad de la obstrucción. De esta manera, en torno a un tercio (36.7%) de los pacientes con EPOC muy grave (grado 4 de la GOLD) estaban colonizados frente a un 5.3% de los pacientes con menor afectación funcional (grados

0-3). Así, aunque este estudio no demuestra causalidad sí sugiere fuertemente que la colonización por *Pneumocystis jirovecii* podría intervenir en la progresión de la EPOC (Morris et. al.,2004).

Otra línea de evidencia a favor de la asociación entre colonización por *Pneumocystis* y EPOC es la tendencia de los pacientes con infección VIH a desarrollar enfisema y a ser portadores del patógeno. Díaz y cols. publicaron que el 40% de los pacientes fumadores con infección VIH sin historia de infección respiratoria desarrollan enfisema diagnosticado por TAC y pruebas funcionales respiratorias, frente a ninguno de los controles pareados por historia de hábito tabáquico. Los niveles de linfocitos T CD8+ en el LBA de estos pacientes fumadores con enfisema eran significativamente mayores que en los pacientes fumadores que no desarrollaron enfisema (Díaz et. al., 2000).

Además, se ha demostrado que los pacientes no fumadores con infección por el VIH también tienen mayor riesgo de desarrollar un enfisema. Un estudio multicéntrico en muestras de tejido pulmonar de autopsias de pacientes VIH, revela que el 16% de los pacientes que no eran fumadores tenían datos de enfisema (Morris et. al., 2009). Aunque no existía grupo control en este estudio, la prevalencia de enfisema encontrada en esta población no fumadora es mucho más alta de la esperada. Con ello sugieren que la existencia de una infección subclínica o latente podría tener un papel en esta mayor tendencia al desarrollo de enfisema de estos pacientes, aunque hasta la fecha no hay estudios que corroboren esta hipótesis.

Por tanto, sería planteable la posibilidad de que la colonización por *Pneumocystis*, situación frecuente en los pacientes con infección VIH, fuera uno de los factores que intervinieran en la elevada frecuencia de enfisema observada en este grupo de pacientes.

Otro argumento que sugiere la asociación entre *Pneumocystis* y EPOC es la capacidad del patógeno de producir obstrucción bronquial, fenómeno observado en la PcP.

Así, en una serie de 10 casos de PcP se comunicó una alta incidencia de disfunción de la vía aérea demostrada por un bajo flujo forzado espiratorio (FEF) 25-75%( Fleischman et. al., 1996). En otro estudio de 169 pacientes con infección VIH

encontraron que el VEF1 y la DLco (capacidad de difusión del monóxido de carbono) estaban disminuidos en los sujetos con PcP, siendo estas alteraciones de carácter permanente y no en relación con la fase aguda de la infección (Shaw et. al., 1988). Por otra parte, en una cohorte prospectiva de 1100 pacientes con infección VIH, con un seguimiento medio de 4 años, donde se realizaban pruebas funcionales respiratorias de forma periódica, se diseñó un estudio de función pulmonar después de sufrir una PcP observando que estos sujetos tenían un acelerado descenso en el VEF1, VEF1 CVF y la DLco más allá de lo esperado para su edad y su historia de fumador (Morris et. al., 2000).

Estos cambios en la función pulmonar son indistinguibles de aquellos que aparecen en los enfermos con EPOC y persisten durante años después de que se resuelva la infección aguda, si bien es cierto que hasta la fecha no se ha estudiado el efecto sobre los parámetros de función respiratoria de la colonización por *Pneumocystis*.

## JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que existe una elevada prevalencia de infección inaparente o colonización por *Pneumocystis* (infección por el patógeno sin evidencia de manifestaciones clínicas) en pacientes con EPOC.

La colonización por *Pneumocystis* en los pacientes con EPOC, a través de los cambios que produce a nivel alveolar y de la respuesta inmunitaria que desencadena, sería capaz de inducir una respuesta inflamatoria local y sistémica que podría favorecer la progresión de esta enfermedad.

Todo ello permite plantear la posibilidad de que la colonización por *P. jirovecii* en pacientes con EPOC pueda desencadenar o favorecer la progresión de este proceso a través de los mecanismos anteriormente descritos que hoy se consideran claramente involucrados en su fisiopatología

La demostración de este hecho tendría una gran importancia clínica pues disponemos de fármacos efectivos y de bajo coste como el cotrimoxazol para el tratamiento de la infección por *Pneumocystis*, que podrían mejorar el pronóstico de los pacientes con EPOC que presentaran esta infección.

Sin embargo, existe escasa información sobre el efecto inmunopatológico que la colonización por *Pneumocystis* pudiera tener sobre la EPOC.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar el posible efecto de *Pneumocystis jirovecii* sobre la fisiopatología de la enfermedad pulmonar obstructiva, a través de la respuesta inmune que induce a nivel local y sistémico en estos pacientes con EPOC.

### **Objetivos específicos**

Determinar en nuestro medio la prevalencia de colonización por *Pneumocystis jirovecii* y la tasa de exposición al patógeno en pacientes con EPOC.

Conocer la prevalencia de colonización en los diferentes estadios de la EPOC y evaluar la posible relación entre la colonización y la gravedad de la obstrucción espirométrica.

Conocer la distribución de genotipos del patógeno en los pacientes con EPOC y la prevalencia de pacientes infectados con mutaciones asociadas a la resistencia al cotrimoxazol.

Identificar los cambios específicos que la colonización por *Pneumocystis jirovecii* pudiera condicionar en la respuesta inmunitaria local y sistémica en los pacientes con EPOC.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1. Ámbito de estudio y diseño**

Este estudio ha sido realizado en el Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla dentro del Grupo de Epidemiología Clínica y Molecular. Se trata de un grupo multidisciplinar formado por médicos pertenecientes al Servicio de Medicina Interna e investigadores farmacéuticos y biólogos adscritos al grupo, ubicados en el Instituto de Biomedicina de Sevilla y que pertenecen al CIBER de Epidemiología y Salud pública. Adicionalmente para la realización de este estudio han colaborado los Servicios de Microbiología e Inmunología de dicho hospital.

Para cubrir los objetivos del presente trabajo se abordaron dos estudios de forma secuencial con aproximaciones metodológicas y resultados diferentes, que merecen por ello, consideración de forma independiente:

- Estudio transversal de la colonización por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)
- Estudio de casos y controles sobre la respuesta inflamatoria sistémica inducida por *P. jirovecii* en sujetos con EPOC colonizados (casos) y sin colonización (controles) por el microorganismo.

### **1.1 Estudio transversal**

Los pacientes fueron atendidos de forma consecutiva en el Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Virgen del Rocío entre el 1 de marzo de 2007 y el 31 de diciembre de 2009, cumplían todos los criterios de inclusión y ningún criterio de exclusión y aceptaron mediante consentimiento informado participar en el estudio.

#### **Criterios de inclusión**

- Edad > 18 años
- Diagnóstico previo de EPOC
- Obstrucción permanente del flujo aéreo definida por un VEF1 (volumen espiratorio forzado en el primer segundo) menor del 70% del valor de referencia con

una reversibilidad tras la administración de beta-agonistas/salbutamol menor del 11% o de 200 ml sobre el valor basal

-Posibilidad de obtener una muestra de esputo espontáneo

-Consentimiento informado del paciente

### **Criterios de exclusión**

-Diagnóstico concomitante de otra enfermedad pulmonar diferente a la EPOC

-Diagnóstico confirmado o sospecha de neoplasia

-Inmunodepresión de cualquier origen: enfermedad autoinmune, trasplante, uso crónico de esteroides inhalados o sistémicos o de otros fármacos inmunomoduladores

-Diagnóstico de infección respiratoria aguda y/o exacerbación de la EPOC en el mes previo a la inclusión en este estudio

## **1.2. Estudio de casos y controles**

Con objeto de verificar la reproductibilidad de los resultados obtenidos sobre respuesta inflamatoria sistémica en el estudio transversal, en una segunda fase se realizó un estudio de casos y controles.

Como casos se incluyeron todos los pacientes con EPOC en situación clínica estable, colonizados por *P. jirovecii*, evaluados en la unidad de Medicina de Interna del Hospital Universitario Virgen del Rocío para determinar la infección por este patógeno en estudios previos (Calderon et al., 2007). Se incluyeron aquellos pacientes de los que se disponía de una muestra sérica de archivo para evaluar la respuesta inflamatoria sistémica.

Por cada caso se incluyeron dos controles con EPOC en los que no había evidencias moleculares de colonización por *P. jirovecii*, igualmente reclutados en estudios previos y con disponibilidad de muestras séricas. Los controles fueron pareados con los casos por características clínicas (edad, sexo, hábito tabáquico) y estadio de la EPOC según los criterios de la clasificación de la GOLD. De esta forma,

se incluyeron en el estudio de casos y controles un total 126 pacientes con EPOC: 42 colonizados por *Pneumocystis* (casos) y 84 no colonizados (controles).

## **2. Parámetros evaluados**

### **2.1. Evaluación clínico-epidemiológica**

De cada uno de los pacientes incluidos en ambos estudios se realizó una evaluación clínico-biológica en la que se registraron los siguientes parámetros:

- Datos demográficos: sexo, fecha de nacimiento, población de residencia

- Datos clínicos: antecedentes patológicos, hábitos tóxicos incluyendo historia tabáquica, forma clínica de la EPOC (bronquitis crónica, enfisema, otros) y estadiaje de la enfermedad según los criterios de la clasificación de la gravedad de la limitación al flujo aéreo en la EPOC a partir del VEF1 post-broncodilatador de la GOLD (GOLD, 2014):

Estadio 1 o EPOC leve (VEF1 > 80% del teórico esperado)

Estadio 2 o EPOC moderada (VEF1 80-50%)

Estadio 3 o EPOC grave (VEF1 50-30%)

Estadio 4 o EPOC muy grave (VEF1 < 30%)

- Pruebas de imagen: Radiografía de tórax

- Pruebas funcionales respiratorias: gasometría arterial, espirometría

Asimismo, de cada uno de los sujetos incluidos en el estudio se obtuvieron muestras de esputo y suero que se mantuvieron criopreservadas a -20°C hasta su procesamiento.

### **2.2. Evaluación microbiológica**

En todos los pacientes se determinó la presencia *Pneumocystis jirovecii* mediante la identificación del gen mtLSUrRNA utilizando PCR anidada (PCR tipo *nested*) en muestras de esputo.

La colonización se definió como la identificación de ADN del patógeno en dos determinaciones independientes en un sujeto sin síntomas o signos de neumonía.

En los pacientes colonizados se identificó el gen que codifica la dihidropteroato sintetasa (DHPS).

La caracterización de los polimorfismos de los genes mt LSU rRNA y DHPS se realizó utilizando técnicas de secuenciación directa para el gen mt LSU rRNA y ensayos de RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) utilizando enzimas de restricción para el locus DHPS.

En todos los pacientes del estudio transversal se descartó la presencia de infección respiratoria por otros patógenos mediante técnicas microbiológicas convencionales de tinción y cultivo en muestras de esputo, realizadas de forma rutinaria en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

### **2.3 Evaluación inmunológica**

- En todos los pacientes del estudio transversal se incluyó la determinación de los siguientes parámetros:

a) Determinación cualitativa de anticuerpos específicos frente a *Pneumocystis* en suero; mediante un ensayo de Western Blot puesto a punto en nuestro laboratorio.

b) Cuantificación de los niveles de citoquinas proinflamatorias (TNF-alfa, IL-6, IL-8) y de la proteína MCP-1 en esputo y suero medidos por técnicas de ELISA comercial (Endogen, Londres, Gran Bretaña)

- En los pacientes del estudio de casos y controles se incluyó la determinación de los niveles séricos de las citoquinas proinflamatorias: IL-6, IL 8, del factor TNF-alfa y la proteína MCP-1. Todos los marcadores fueron medidos por técnicas de ELISA comercial (Endogen, Londres, Gran Bretaña)

### **3. Variables de estudio**

- Estudio transversal
- 1) Prevalencia de colonización por *P. jirovecii*
- 2) Tasa de exposición a *Pneumocystis*
- 3) Genotipos de *Pneumocystis* (genes mt LSU rRNA y DHPS)
- 4) Respuesta inflamatoria local: citoquinas en esputo
- 5) Respuesta inflamatoria sistémica: citoquinas séricas
- Estudio de casos y controles
- 6) Respuesta inflamatoria sistémica: citoquinas séricas

### **4. Técnicas de laboratorio**

#### **4.1. Obtención y almacenamiento de las muestras**

- Espuito: Se obtienen muestras de esputo espontáneo en las consultas de nuestra unidad que se remiten al área de laboratorio.

Inmediatamente las muestras de esputo se dividen en dos alícuotas, una de ellas se remite al servicio de microbiología donde se centrifugan, para separar el sobrenadante del botón celular. Posteriormente se realiza un recuento celular total y el análisis de la viabilidad celular mediante citometría estándar e inmunohistoquímica. Solo se consideran adecuadas aquellas muestras con un recuento de células escamosas epiteliales menor del 15%.

Una alícuota se envía al laboratorio de investigación, se toma una muestra de unos 2 ml de esputo que en fresco que se disgrega utilizando una jeringa de 20g y se distribuye en alícuotas de 500 µl que se mantiene a -20°C hasta la extracción de ADN.

- Muestras séricas: Las muestras de sangre obtenidas se centrifugan a 3000 rpm durante 5 minutos. Se toma el suero y se descarta el tapón coagulado. El suero se divide en dos alícuotas y se congela hasta su utilización a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2. Extracción de ADN**

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de cada una de las alícuotas de 500  $\mu\text{l}$  de esputo, utilizando el kit comercial *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel, Alemania).

La digestión de la muestra de esputo se realiza con un protocolo específico que asegura la disgregación y conservación adecuada de las muestras a  $56^{\circ}\text{C}$  en baño termostático, en agitación durante la noche, utilizando como agente quelante EDTA a un concentración de 2mM y  $\text{pH}=8$ , como detergente SDS a una concentración del 10% y Proteinasa K a una concentración de 14mg/ml.

Una vez digeridas las muestras, el proceso de extracción y purificación del ADN genómico de las células se realizó mediante una cromatografía de adsorción en columnas. Para ello se utilizó un kit comercial (*Nucleospin tissue*, Macherey & Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante tal y como se especifica en el Anexo I. El ADN extraído se eluyó con 60  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis.

#### **4.3. Identificación y caracterización molecular de *P. jirovecii***

##### **4.3.1. Técnicas de amplificación del ADN**

La identificación molecular y la posterior determinación de los polimorfismos de *P. jirovecii* se realizó en dos *loci* independientes del genoma del microorganismo: el gen mitocondrial de la subunidad mayor del ribosoma (mtLSUrRNA) y el gen DHPS. El gen multicopia, mtLSUrRNA, se caracteriza por estar ampliamente conservado, este gen interviene en funciones metabólicas básicas del patógeno. El gen DHPS codifica la síntesis de la enzima dihidropteroato sintetasa, diana de acción del sulfametoxazol, fármaco de elección para el tratamiento y la profilaxis de la infección por *Pneumocystis* y en el que se han descrito mutaciones puntuales que le confieren una distinta susceptibilidad al fármaco.

La detección de la región mtLSUrRNA se realizó mediante PCR tipo *nested*. La identificación de los diferentes genotipos del fragmento mtLSUrRNA se realizó mediante secuenciación directa del producto amplificado de la PCR.

La amplificación del gen que codifica la DHPS se realizó mediante PCR de tipo *touchdown*. Para la identificación de las mutaciones en los codones 55 y 57, se realizó un ensayo con enzimas de restricción que permite la identificación de mutaciones puntuales en el fragmento previamente amplificado por PCR.

#### **4.3.2. Identificación del gen mt LSU rRNA**

**PCR *nested* en esputo.** La identificación de ADN de *P. jirovecii* se realizó mediante una variante de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) (PCR-*nested*) utilizando el ADN genómico aislado de las muestras de esputo. Se amplificó un fragmento del gen de la región mitocondrial mt LSU rRNA de *Pneumocystis jirovecii*, utilizando los cebadores externos paZ102E- paZ 102H que amplifican una secuencia de 346 pares de bases. La mezcla de PCR se preparó para un volumen final de 25  $\mu$ l, que incluía: 3 $\mu$ l del ADN extraído de cada alícuota, 2,5  $\mu$ l de NH<sub>4</sub> reaction Buffer 10x (Bioline), 0,25  $\mu$ l de Taq (BioTaq DNA pol. 5U/  $\mu$ l de Bioline), 0,5  $\mu$ l de una mezcla de nucleótidos trifosfato (1 $\mu$ M de cada dNTP), 0,5  $\mu$ l de cada cebador (concentración de 20  $\mu$ M cada uno) y 0,75  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 50mM

Tras la primera ronda de amplificación se extrae ADN preamplificado de la primera reacción y se realiza un nuevo protocolo de PCR. En esta ocasión, la mezcla de reacción es similar salvo por los cebadores utilizados, que son los cebadores internos paZ 102X- paZ 102Y que amplifican una región de 256 pares de bases del mismo gen. La mezcla de PCR para esta segunda ronda se preparó para un volumen final de 50  $\mu$ l, que incluían: 5 $\mu$ l de ADN, 5  $\mu$ l de NH<sub>4</sub> reaction Buffer 10x (Bioline), 0,5  $\mu$ l de Taq (BioTaq DNA pol. 5U/  $\mu$ l de Bioline), 1  $\mu$ l de una mezcla de nucleótidos trifosfato (1 $\mu$ M de cada dNTP), 1,2  $\mu$ l de cada cebador a una concentración de 20  $\mu$ M cada uno y 1,5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 50mM.

La amplificación de ADN mediante PCR se realiza en el termociclador suministrado por Biometra (Hilden, Alemania) siguiendo para ambas rondas el programa PC 40 que consiste en un primer ciclo de desnaturalización de 94°C

durante 5 min. Seguido de 35 ciclos de amplificación que comprende tres fases: desnaturalización 92°C durante 30 segundos, unión del cebador 55°C durante 30 segundos y extensión de la polimerasa durante 2 minutos. Finalmente, tras los 35 ciclos de amplificación se programa un segmento de extensión a 72°C durante 2 minutos.

Las tablas 2 y 3 muestran las condiciones de la PCR nested, los cebadores utilizados y el tamaño del fragmento amplificado para cada una de las rondas.

**Tabla 2:** Condiciones de la primera ronda de amplificación utilizada para detectar la presencia del locus mtLSU

1ª Ronda de PCR nested				Características
Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Cebadores: pAZ102-E 5'-GATGGCTGTTTCCAAGCCCA-3' pAZ102-H: 5'-TCACTTAATATTAATTGGGGAGC-3'  Tamaño del amplificado: 356pb
Activación	1	94°C	5 min	
Desnaturalización	35	92°C	30 seg	
Alineamiento		55°C	30 seg	
Elongación		72°C	2 min	
Elongación final	1	72°C	5 min	

°C, grados centígrados; min., minutos; seg., segundos; pb, pares de bases.

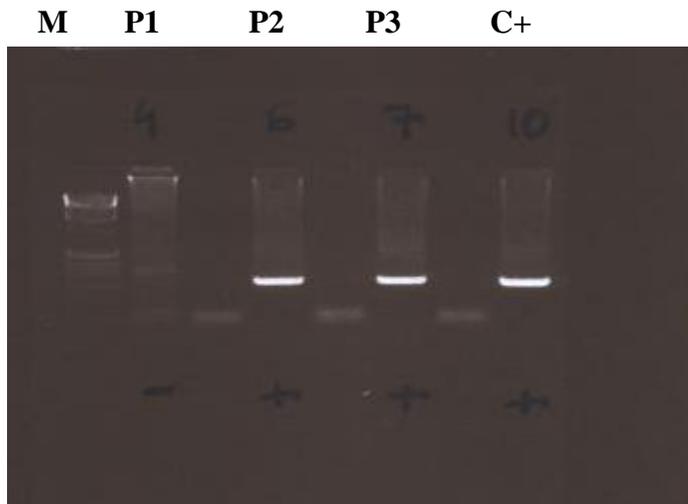
**Tabla 3:** Condiciones de la segunda ronda de amplificación utilizada para detectar la presencia del locus mtLSU

2ª Ronda de PCR nested				Características
Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Cebadores: pAZ102-X: 5'-GTGAAATACAAATCGGACTAGG-3' pAZ102-Y: 5'-TCACTTAATATTAATTGGGGAGC-3'  Tamaño del amplificado: 260pb
Activación	1	94°C	5 min	
Desnaturalización	40	92°C	30 seg	
Alineamiento		55°C	30 seg	
Elongación		72°C	2 min	
Elongación final	1	72°C	5 min	

°C, grados centígrados; min, minutos; seg, segundos; pb, pares de bases.

Los productos de amplificación de ambas PCR, se revelaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% que contenía bromuro de etidio, y las bandas se visualizan mediante luz ultravioleta. La identificación de una banda de 256 pares de bases indica la presencia de ADN de *P. jirovecii* en la muestra analizada.

Para evitar falsos positivos debido a una posible contaminación, en todas las etapas de manipulación de las muestras se utilizaron puntas de pipeta con filtro. La preparación de la mezcla de reacción, la amplificación por PCR y la detección se realizaron en diferentes recintos del laboratorio. Para detectar una posible contaminación cruzada, todas las reacciones de PCR llevaban como control negativo H<sub>2</sub>O estéril. (Figura 4)



**Figura 4:** Detección de la banda de 256 pb correspondiente al locus mt LSU rRNA de *P. jirovecii* en gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio  
M: marcador de peso molecular; P1, P2, P3: muestras de pacientes; C+: control positivo

#### 4.3.3. Polimorfismos del gen mt LSU rRNA

La identificación de los polimorfismos del gen mt LSU rRNA se realizó a partir del fragmento previamente amplificado en las muestras positivas. Para obtener ADN susceptible de ser secuenciado es necesario primero realizar una purificación de los productos de PCR mediante cromatografía de exclusión molecular

La purificación de los amplicones; la reacción de secuenciación y posterior de la precipitación de la muestra se realizan siguiendo el protocolo que se detalla en el Anexo II.

Por último, en un secuenciador *ABIS Prism 310 genetic analyzer* (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) se realiza la secuenciación mediante electroforesis capilar de los fragmentos de ADN de diferentes tamaños sintetizados durante la reacción de secuenciación. Según la técnica las elongaciones quedaron interrumpidas al incorporar un dideoxinucleótido trifosfato marcado con un fluorocromo que permite su identificación selectiva.

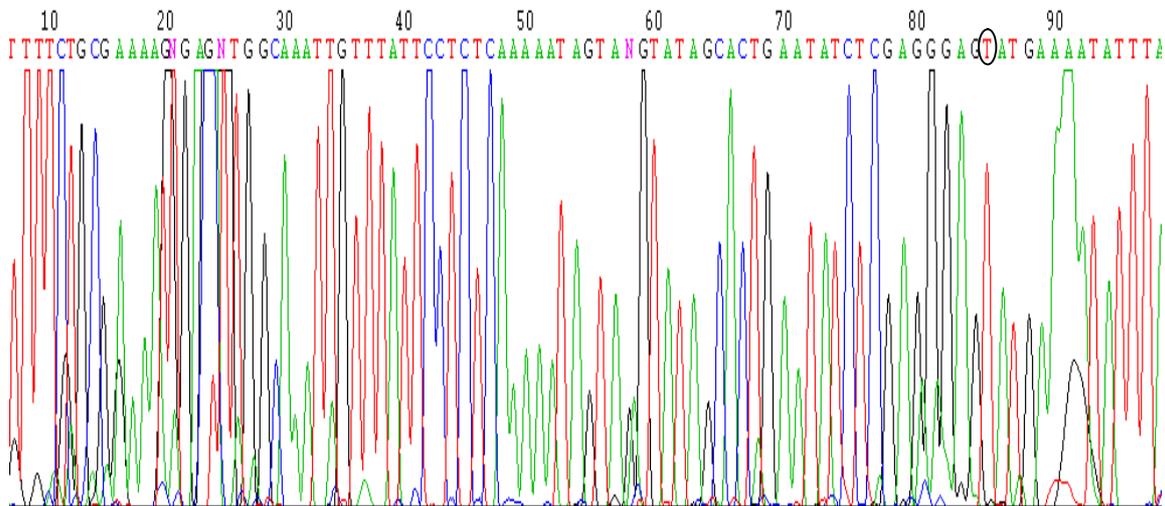
Hasta la fecha en esta región del genoma se han descrito 6 subtipos en función de los diferentes polimorfismos identificados en las posiciones 85 y 248 del gen (tabla 4).

Para el análisis de las secuencias obtenidas se utiliza, en nuestro caso, el software de Macintosh Sequence Navigator de PE-Applied Biosystem. En las figuras 5 y 6 se muestran dos ejemplos de los resultados de la secuenciación obtenidos para los polimorfismos 85 y 248.

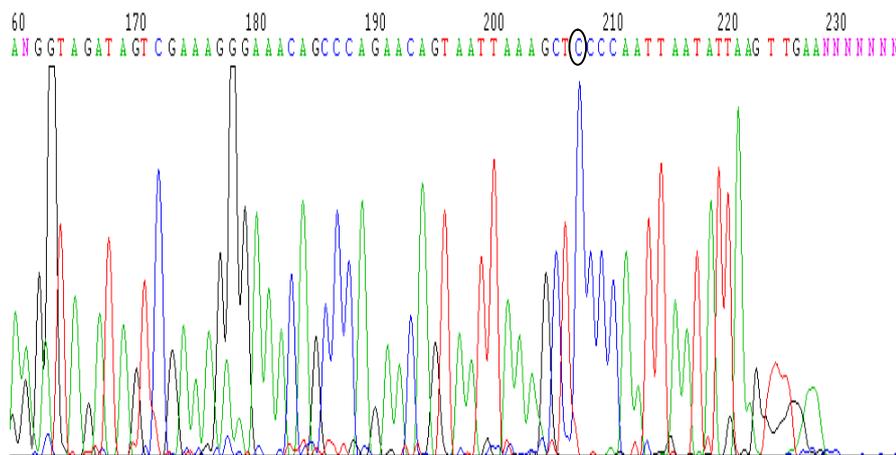
**Tabla 4:** Genotipos mtLSU de *P. jirovecii* identificados en nuestro medio

NUCELÓTIDO		GENOTIPO
Posición 85	Posición 248	
C	C	1
A	C	2
T	C	3
C	T	4

A: Adenina, C: Citosina, T: timina.



**Figura 5:** Secuencia del polimorfismo en posición 85 del gen mt LSU rRNA de *P. jirovecii*



**Figura 6:** Secuencia del polimorfismo en la posición 248 del gen mt LSU rRNA de *P. jirovecii*

### 3.4. Identificación del gen de la dihidropteroato sintetasa (DHPS)

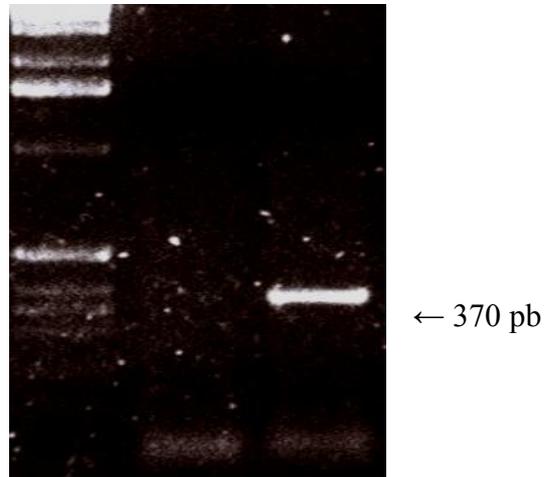
Para amplificar el gen de copia única que codifica la síntesis de la enzima dihidropteroato sintetasa (DHPS) se utilizó un protocolo de PCR tipo *touchdown*, que se caracteriza por incluir diez ciclos iniciales de amplificación en los que la temperatura de unión del cebador al ADN va disminuyendo 1° C por ciclo. Se utilizaron los cebadores DHPS-3 y DHPS-4, cuyas secuencias y condiciones de la PCR se detallan en la Tabla 5. La mezcla de reacción de la PCR se llevó a un volumen final de 26 µl, y estaba compuesta por 4µl de ADN, 2,5 µl de buffer de reacción de NH<sub>4</sub> 10x, 0,25 µl de Taq polimerasa a 5 u/µl, 0,5 µl de una mezcla de nucleótidos trifosfato (1µM de cada dNTP suministrados por Roche), 0,5 µl de cada cebador a una concentración de 20 µM cada uno, 1 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM y 16,75 µl de agua.

Tras la amplificación y posterior electroforesis en gel de agarosa, la visualización de una banda de 370 pb tal y como se muestra en la figura 7, indicaba la presencia de ADN de *P. jirovecii* en la muestra problema.

**Tabla 5:** Condiciones de la PCR utilizada para detectar la presencia del locus DHPS.

PCR <i>touch down</i>				Características
Etapas	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Cebadores: DHPS-3: 5'-GCGCCTACACATATTATGGCCATTTTA AATC-3' DHPS-4: 5'-GGAAC TTTCAACTTGGCAACC-3'
Activación	1	94°C	5 min	Tamaño del amplificado: 370pb
Desnaturalización	10	94°C		
Alineamiento		72°C (-1°C/ciclo)		
Elongación	39	72°C		
Desnaturalización		94°C		
-Alineamiento		62°C		
-Elongación		72°C		
Elongación final		72°C	5 min	

°C, grados centígrados; min, minutos; seg, segundos; pb, pares de bases



**Figura 7:** Identificación de la banda de 370 pares de bases (bp) correspondiente al gen DHPS de *P. jirovecii*

#### 4.3.5. Mutaciones en el gen DHPS

Para la identificación de mutaciones asociadas a resistencia en el gen que codifica la DHPS utilizamos la técnica RFLP siglas que provienen del inglés (*restriction fragment length polymorphism*).

Los productos de la reacción de *touchdown* se dividieron en tres alícuotas. La primera alícuota se utilizó como prueba de la amplificación por PCR del gen de la DHPS. Las dos últimas se utilizaron para identificar la presencia de mutaciones frente a la cepa silvestre en los codones de 55 y 57, respectivamente.

Cuando una muestra con cepas silvestres sin mutación en el codón 55 se somete a digestión con la enzima Acc I, se detectan dos fragmentos de ADN de 229 y 141 pb, respectivamente; mientras que si la mutación está presente se detecta una sola banda a 370 pb. De la misma forma, con la enzima Hae III se detectan dos fragmentos de 221 y 149 pb cuando existe una cepa silvestre sin mutación en el codón 57, y una sola banda no cortada de 370 pb si la mutación está presente.

En cuanto a los genotipos encontrados para el locus DHPS, su nomenclatura también se basa en una simple enumeración (tabla 6 y figura 8) y depende de las

posibles mutaciones en los codones 55 y 57. De esta forma, se define como genotipo 1 o genotipo silvestre (55w/57w) aquel que carece de mutaciones en ambos codones. Los genotipos 2 (55m/57w) y 3 (55w/57m) son aquellos que poseen una mutación en el codón 55 y en el 57, respectivamente. Finalmente, el genotipo 4 o doble mutante (55m/57m) presenta mutaciones en ambos codones.

**Tabla 6:** Genotipos DHPS de *P.jirovecii* identificados en nuestro medio

AMINOÁCIDO		GENOTIPO
Codón 55	Condón 57	
Thr (w)	Pro (w)	1
Ala (m)	Pro (w)	2
Thr (w)	Ser (m)	3
Ala (m)	Ser (m)	4

Thr: treonina, Ala: Alanina, Pro: Prolina, Ser: Serina, w: silvestre, m: mutante



**Figura 8.** Imagen de la digestión del producto de amplificación mediante PCR tipo *touch down* con las enzimas de restricción AccI y Hae II.

## 4.4. Estudios inmunológicos

### 4.4.1. Detección de anticuerpos mediante Westen Blot

La determinación de la tasa de exposición a *Pneumocystis* en el suero de los pacientes se midió utilizando un ensayo de inmunotransferencia para detectar la presencia de anticuerpos frente al microorganismo.

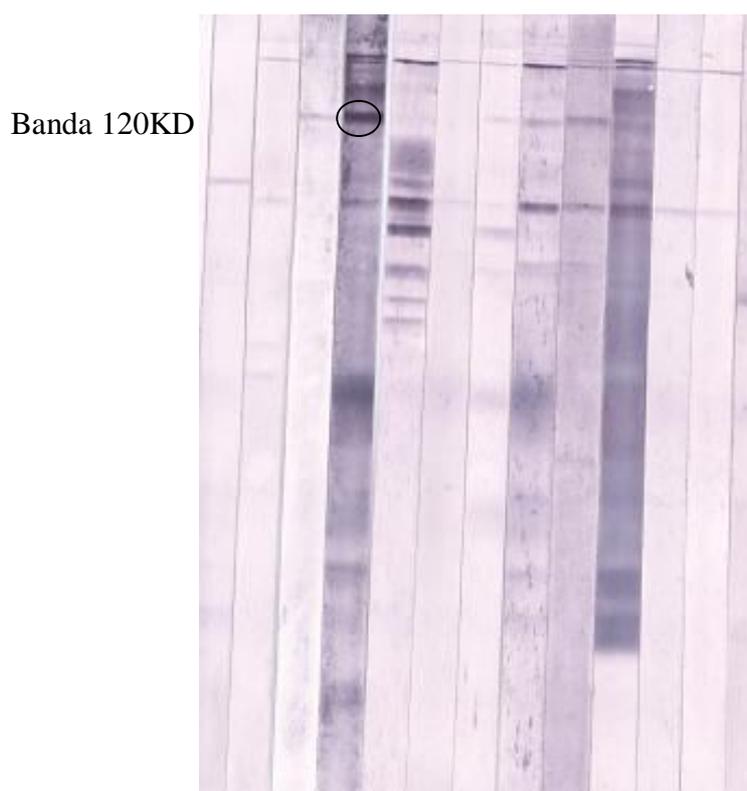
El antígeno de *Pneumocystis carinii* se obtuvo de un modelo animal descrito por (Aliouat et. al. 1997), que provenía del pulmón de ratas Wistar en las cuales la neumocistosis se inducía por tratamiento con dexametasona. La purificación del microorganismo se realizaba tras paso por Histopaque (Sigma- Aldrich) y posterior filtrado. La cuantificación de los quistes de *Pneumocystis* se realizó mediante tinción de Azul de Toluidina. El microorganismo se preservó en alícuotas que contenían  $5 \times 10^8$  quistes/ ml en PBS y conteniendo 10% de DMSO y se congelaron y mantuvieron en nitrógeno líquido.

La electroforesis del antígeno previamente tratado (3 minutos en buffer de lisis que contenía una solución al 2% SDS, 0,06 M Tris-HCL, 5% de 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol y 0,001% de azul de bromofenol) se realizó a 200 v durante 40 minutos utilizando un gel de acrilamida al 15%. Las proteínas se transfieren a la nitrocelulosa a un voltaje de 100 v durante al menos 60 min. Las láminas de nitrocelulosa se tamponan 2h con leche desnatada 30% en TTBS.

El suero de los pacientes se incubó al menos durante 16h a 4°C en una dilución 1:50 de la solución de bloqueo para evitar la unión inespecífica. Posteriormente se incubó con el anticuerpo anti-*Pneumocystis* conjugado con fosfatasa alcalina anti-IgG humana, anticuerpos anti-IgA e IgM (Dako). Como control positivo se utilizó un anticuerpo anti-*Pneumocystis*. Todas las inmunotransferencias se examinaron de forma independiente por dos observadores.

La presencia de una banda reactiva de 120 KDa fue interpretado como resultado positivo, independientemente de la intensidad en la tinción de la misma. Se usó un anticuerpo monoclonal anti-*Pneumocystis carinii* de ratón como control positivo con un peso molecular de 120KD (figura 9).

**C- P1 P2 C+ P3**



**Figura 9:** Western blot de sueros de pacientes, C, control negativo; C+, control positivo; P1, P2, P3: muestras de pacientes

#### **4.4.2. Cuantificación de citoquinas mediante ELISA**

La preparación de las muestras de esputo para la detección de citoquinas se realizó siguiendo la técnica previamente descrita (Barczyk et.al., 2004) tal y como se detalla a continuación.

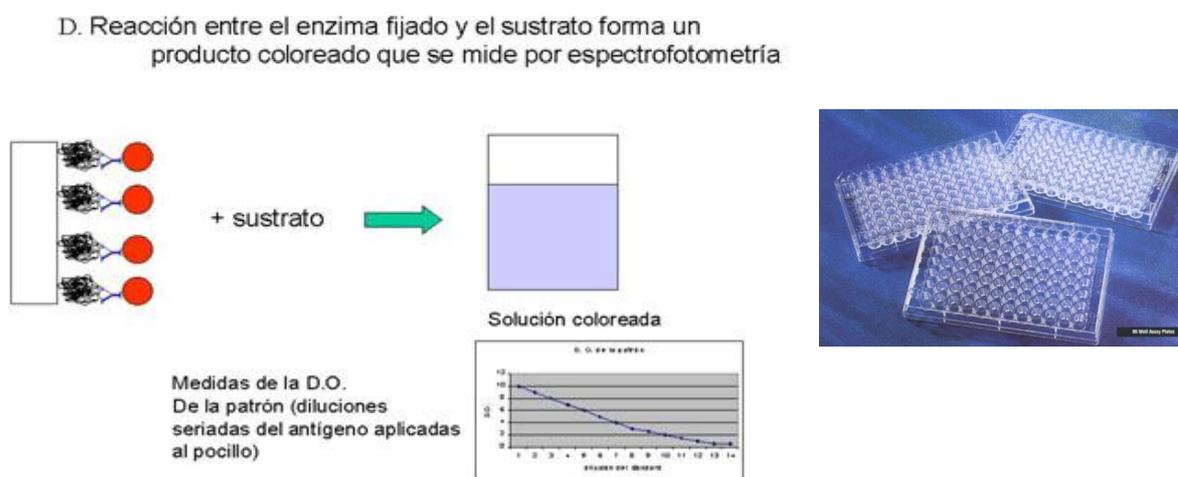
Se toman 250  $\mu$ l de esputo y se pasa por jeringa de 22 g para homogeneizarlo. Se añaden 250  $\mu$ l de DTT 0.1% en PBS. La mezcla se incuba a 37°C durante 15 minutos. Tras centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se pasa a un eppendorf limpio y se centrifuga nuevamente a 3000 rpm durante 5 minutos. Se desecha el pellet y en el sobrenadante que obtenemos se determina la concentración de proteínas siguiendo un protocolo comercial que permite evaluar las proteínas totales que tiene la muestra mediante la reacción de Bradford, con el fin de homogeneizar los resultados obtenidos. Posteriormente la determinación de la citoquinas se realiza en el sobrenadante obtenido.

En el estudio transversal los niveles de citoquinas en pacientes con EPOC se midieron mediante una técnica comercial de inmunoensayo con amplificación enzimática en el laboratorio de investigación de nuestro grupo. Los niveles de IL-6, TNF-alfa, IL-8, y MCP-1 se determinaron mediante una reacción entre el enzima fijado en los pocillos de la placa y la muestra problema (suero o esputo) que forma un producto coloreado que puede medirse mediante espectrofotometría (figura 10).

Los límites de detección para IL- 8 , TNF-alfa, e IL- 6 eran 3 pg / ml, 0,06 pg / ml, y 0,70 pg / ml, respectivamente. El límite de detección para MCP-1 fue de 10 pmol/mL.

En el estudio de casos y controles la determinación de los niveles de citoquinas en muestras séricas se realizó mediante un ensayo similar al descrito anteriormente, cuantificándose también los niveles de de IL-6, TNF-alfa, IL-8, y MCP-1 con una técnica de ELISA comercial (Endogen, Londres, Gran Bretaña).

Los ensayos estaban disponibles comercialmente y se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante, el protocolo se incluye como Anexo III.



**Figura 10:** Esquema de los fundamentos del ELISA comercial

## **5. Recogida y análisis de datos**

Los datos epidemiológicos, clínico-biológicos y microbiológicos se recogieron en un formato estandarizado (Anexo IV, CRF Muestras Eurocarinii). Estos datos fueron traspasados a soporte magnético mediante procedimientos operativos que contemplaron: doble introducción de información, contraste automático de datos, detección de valores atípicos y rutinas de depuración lógica para detección de inconsistencias.

Toda la información se introdujo en una base de datos construida expresamente para este proyecto, garantizando mediante la encriptación bajo código el cumplimiento de la normativa vigente sobre protección de datos de carácter personal (Ley Orgánica 15/1999).

Se realizó una estadística descriptiva de las variables del estudio. Para las variables cualitativas se utilizaron frecuencias absolutas y relativas. Las variables cuantitativas se expresaron como media, desviación estándar ( $Md \pm DE$ ).

Para evaluar la relación entre la colonización y el resto de parámetros de estudio, se usó el test de la Chi-cuadrado y en los casos en que fue necesario, se empleó la prueba T de Student para muestras independientes o la prueba U de Mann-Whitney para las variables cuantitativas, según siguieran o no una distribución normal, respectivamente.

El nivel de significación estadística se estableció para un valor de  $p < 0,05$ . El análisis estadístico se realizó con el paquete IBM SPSS Statistics 19.0.

## **6. Aspectos éticos**

En el presente estudio se aplicaron los principios éticos recogidos en la última revisión de la Declaración de Helsinki, así como los recogidos en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los Derechos Humanos y la Biomedicina y en la Declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos. Se cumplieron todos los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter

personal y la bioética. El presente estudio contó con la aprobación oficial del Comité de Ética de la Investigación del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla.

La participación en el proyecto fue voluntaria y la solicitud de participación fue realizada como una propuesta de investigación en salud, independiente del proceso asistencial convencional del sistema sanitario.

A cada participante se le informó por escrito de la naturaleza de la investigación y del uso de la información obtenida, así como de su derecho al acceso, modificación o eliminación de los registros en cualquier momento. Se garantizó la confidencialidad de sus datos, así como la utilización de los mismos para los fines especificados del estudio. Además de la información verbal a los participantes, se solicitó un consentimiento informado por escrito (Anexo V).

Toda la información clínico-epidemiológica así como las muestras biológicas obtenidas fueron codificadas y separadas de los datos personales de los sujetos, encriptados y custodiados por el investigador principal de este proyecto.

## **RESULTADOS**



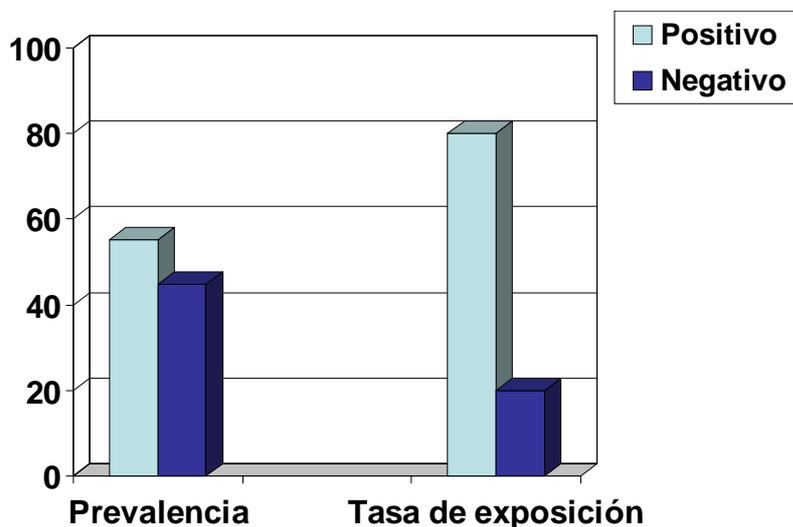
## 1. Estudio transversal

Se incluyeron un total de 58 pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, en situación clínica estable. Entre los pacientes incluidos en el estudio 48 eran hombres y 10 mujeres, con una edad media de  $72,2 \pm 9,3$  años. El 36% de los sujetos eran fumadores activos en el momento de inclusión. Respecto a la situación funcional respiratoria, el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF1) medio fue del 44,95%. El recuento de linfocitos totales y leucocitos totales (media  $\pm$  DE) fue de  $16770,5 \pm 816.3$  y  $10598 \pm 4739.8$  células/mm<sup>3</sup>, respectivamente en los pacientes con EPOC.

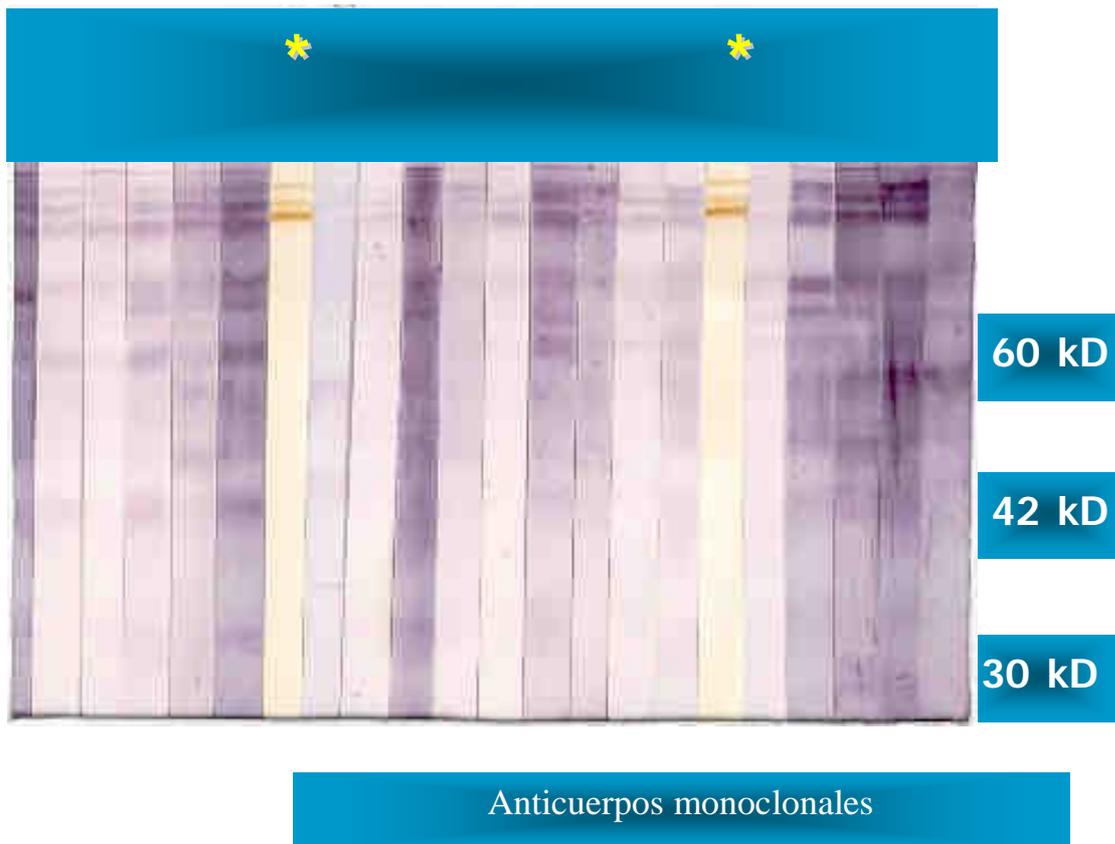
### 1.1. Prevalencia de colonización y tasa de exposición a *Pneumocystis*

De acuerdo con los criterios diagnósticos considerados 32 de los 58 pacientes con EPOC incluidos en el estudio estaban colonizados por *Pneumocystis*, lo que representa una prevalencia de colonización del 55,1% (figura 11).

Por otra parte, en el Western blot se detectó la presencia de anticuerpos séricos específicos frente a *Pneumocystis* en 47 de los 58 pacientes, lo que indica una tasa global de exposición del 81% (figuras 11 y 12).



**Figura 11:** Prevalencia de colonización y tasa de exposición a *Pneumocystis* en 58 pacientes con EPOC (estudio transversal). Los datos se expresan en porcentajes.



**Figura 12:** Determinación de anticuerpos frente a *Pneumocystis* mediante Western blot del suero de los pacientes: la presencia de una banda inmunorreactiva en la posición 120 Kd fue interpretada como un resultado positivo. \*Anticuerpo monoclonal de ratón frente a *Pneumocystis* (clona 3F6 de Dako Cytomation).

## 1.2. Características de los pacientes y su relación con la colonización

De acuerdo con los criterios del estudio, ninguno de los pacientes con EPOC evaluados presentaba en el momento de su inclusión alguna situación clínica tal como reagudización de su patología que pudiera contribuir a la activación de la respuesta inmune. En todos los casos se descartó la presencia de infección por otros patógenos mediante un cultivo de esputo realizado de manera rutinaria por el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

Las características demográficas y biológicas más relevantes de los pacientes incluidos en relación con la presencia o no de colonización, así como el volumen espiratorio forzado en el primer segundo, que define la severidad de la obstrucción en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, se muestran en la tabla 7.

No se encontraron diferencias en los pacientes analizados en cuanto a edad, sexo, hábito tabáquico y parámetros funcionales respiratorios cuando comparamos aquellos pacientes colonizados con los no colonizados por *P. jirovecii*.

Tampoco se objetivaron diferencias en los dos grupos de pacientes estudiados en el recuento de linfocitos totales y leucocitos.

**Tabla 7:** Variables demográficas, clínicas y biológicas según colonización por *P. jirovecii*

Variable	Sujetos colonizados (n=32)	Sujetos no colonizados (n=26)	p
Edad (edad media ± DE)	74 ± 8,6	70,1 ± 9,8	0.14 <sup>a</sup>
Sexo (% hombres)	91	75	0.13 <sup>b</sup>
Fumador activo (%)	39	33	0.72 <sup>b</sup>
% medio de VEF1 (media ± DE)	42,2 ± 15,3	47,7 ± 23,1	0.52 <sup>a</sup>
Linfocitos totales (cél/μl) (media±DE)	1555,6 ± 901,1	1798,5 ± 731,5	0.36 <sup>a</sup>
Leucocitos (cél/μl) (media±DE)	11242 ± 4135,3	9954.5 ± 5344,4	0.4 <sup>a</sup>

DE, desviación estándar; a Test de T- Student; b Chi cuadrado.

Los pacientes con mayor grado de obstrucción espirométrica mostraron una prevalencia más elevada de colonización por *Pneumocystis* (44,4% en el estadio 1 de la GOLD, 46,1% en el estadio 2, 58,3% en el estadio 3 y 66,6% en el estadio 4), aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística (p= 0.666, prueba de chi-cuadrado) (tabla 8).

**Tabla 8:** Prevalencia de colonización según el estadio de obstrucción espirométrico GOLD de la EPOC

Estadio de la EPOC (VEF1 %)	Total de pacientes, n	Pacientes colonizados, n (%)
1 (80-100)	9	4 (44,4%)
2 (50-80)	13	6 (46,1%)
3 (30-50)	24	14 (58,3%)
4 (0-30)	12	8 (66,6%)

### 1.3 Caracterización molecular de *Pneumocystis jirovecii*

#### 1.3.1. Genotipos en la región mitocondrial mtLSUrRNA

En nuestro estudio, el gen mitocondrial pudo ser secuenciado en 26 de los 32 pacientes colonizados, identificándose 4 de los 6 genotipos descritos para este gen.

Así, se identificó el genotipo 1 (85 C / 248 C) en el 26.6% de los sujetos colonizados, el genotipo 2 (85 A / 248 C) en el 10% y el genotipo 3 (85 T / 248 C) en el 56.6%. Por último, en un 6.6% de los sujetos portadores de *P. jirovecii* se detectó coinfección por mezcla de varios genotipos (85C/248C y 85C/ 248T, 85C/248C y 85A/ 248T), identificándose en uno de estos sujetos el genotipo 4 (tabla 9 y figura 13).

#### 1.3.2. Genotipos en el gen de la DHPS

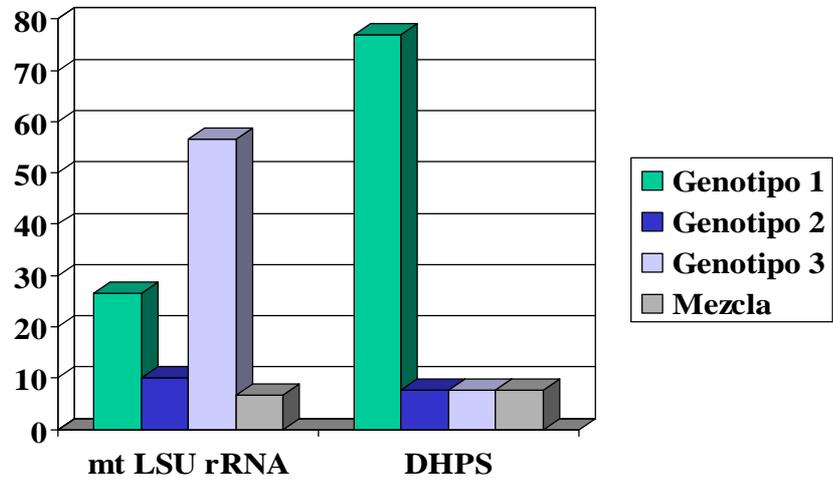
El estudio del gen que codifica la DHPS (dihidropteroato sintetasa), diana de acción del cotrimoxazol, ha permitido identificar mutaciones puntuales tales como 55Thr-Ala y 57Pro—Ser que están asociadas con el fracaso de la profilaxis con cotrimoxazol o dapsona

En el presente estudio el gen DHPS se identificó en 13 de los 32 sujetos colonizados por *P. jirovecii*, debido a que es un gen de copia única. Se identificaron tres de los cuatro genotipos descritos para este gen. Como se muestra en la tabla 9, diez (76.9%) de los sujetos presentaban genotipos silvestres y en tres (23.1%) de los casos se identificaron cepas de *Pneumocystis* asociadas a resistencia a sulfamidas. En concreto, uno de los pacientes presentaba una mutación en el codón 55 (Thr-Ala), otro una mutación en el codón 57 (Pro-Ser) y en el tercero se aisló un genotipo silvestre y mutación en el codón 57 (Pro-Ser) (tabla 9 y figura 13). Ninguno de los tres sujetos con variantes mutantes de la DHPS había recibido tratamiento previo con sulfamidas.

**Tabla 9:** Genotipos de *Pneumocystis* identificados en los pacientes con EPOC colonizados

mt LSUr RNA			DHPS		
Genotipo	Nucleótido	N (%)	Genotipo	Nucleótido	n (%)
1	85 C / 248 C	8 (26.6)	1	165(55)/A(Thr) 171(57)/C(Pro)	10 (76.9)
2	85 A / 248 C	3 (10)	2	165(55)/G(Ala) 171(57)/C(Pro)	1 (7.7)
3	85 T / 248 C	13(56.6)	3	165(55)/A(Thr) 171(57)/T(Ser)	1 (7.7)
Mezcla	85C/248C y 85C/ 248T 85C/248C y 85A/ 248T	2 (6.6)	Mezcla		1 (7.7)

Thr: treonina, Ala: Alanina, Pro: Prolina, Ser: Serina.



**Figura 13:** Frecuencia de genotipos de *P. jirovecii* identificados en los pacientes con EPOC colonizados

## 1.4. Estudio de la respuesta inflamatoria

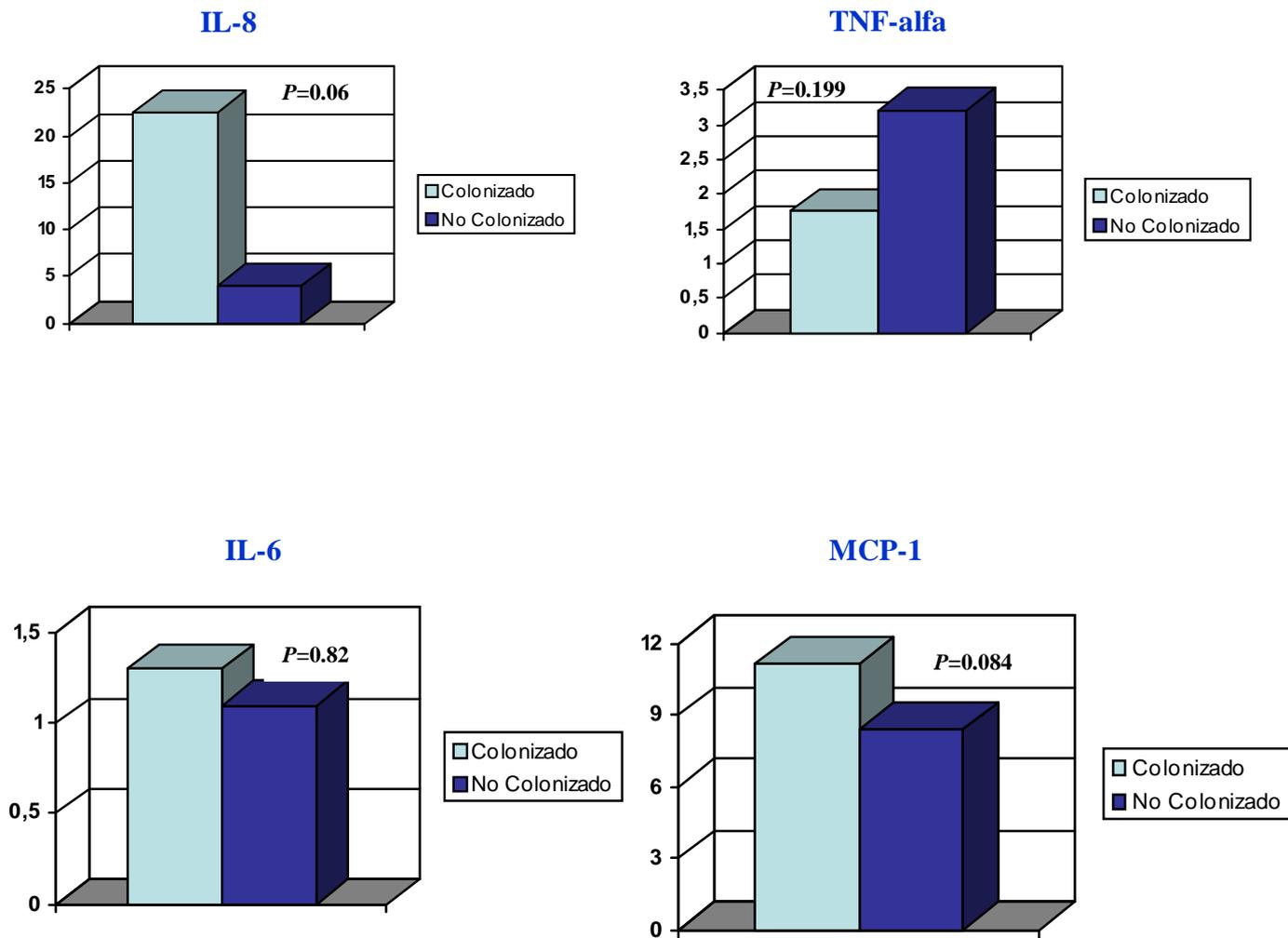
### 1.4.1. Respuesta inflamatoria local

Las muestras de esputo de 18 de los 58 sujetos analizados mostraron un recuento de células escamosas epiteliales mayor del 15% y fueron consideradas inadecuadas para el estudio de la respuesta inflamatoria local. Por tanto, estas determinaciones se realizaron en las restantes 40 muestras de los sujetos en estudio.

Como se muestra en la tabla 10 y en la figura 14, los niveles de TNF-  $\alpha$  e IL-6 en esputo fueron similares en sujetos colonizados y no colonizados; observándose en los sujetos colonizados por *P. jirovecii* mayores niveles de IL-8 y MCP-1 con diferencias respecto a los no colonizados próximas a alcanzar la significación estadística.

**Tabla 10:** Niveles de citoquinas (media  $\pm$  desviación estándar) en esputo en los pacientes con EPOC (estudio transversal)

Niveles de citoquinas (pg/ml)	Sujetos colonizados (n=18)	Sujetos no colonizados (n=22)	<i>p</i> (t-Student)
IL-8	22,4 $\pm$ 15,9	4,1 $\pm$ 1,4	0,06
TNF- $\alpha$	1,75 $\pm$ 0,5	3,2 $\pm$ 1,5	0,199
IL-6	1,3 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 1,2	0,82
MCP-1	11,1 $\pm$ 10,3	8,4 $\pm$ 3,2	0,084



**Figura 14:** Niveles medios de citoquinas en esputo (pg/ml) en los pacientes con EPOC (estudio transversal)

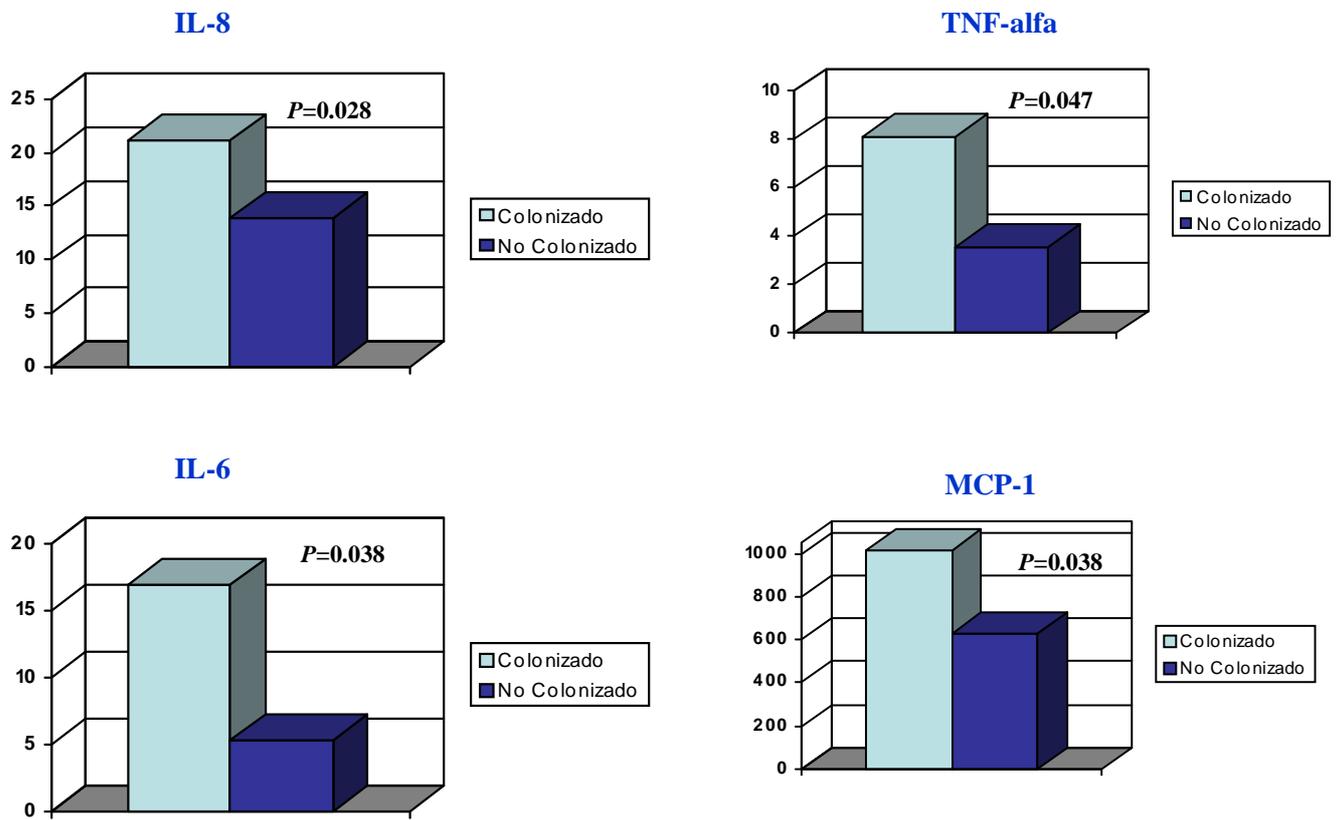
### 1.4.2. Respuesta inflamatoria sistémica

La respuesta inflamatoria sistémica se evaluó en muestras de suero de los 58 sujetos incluidos en el estudio transversal. Las determinaciones se realizaron de manera individual y por duplicado en cada uno de ellos.

Los pacientes colonizados mostraron niveles séricos significativamente elevados de IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-6 y del factor atrayente de macrófagos MCP-1 respecto a los pacientes no colonizados como puede observarse en la tabla 11 y en la figura 15.

**Tabla 11:** Niveles séricos de citoquinas (media  $\pm$  desviación estándar) en los pacientes con EPOC (estudio transversal)

<b>Citoquinas (valores en pg/ml)</b>	<b>Sujetos Colonizados (n=32)</b>	<b>Sujetos no colonizados (n=26)</b>	<b><i>p</i> (t-Student)</b>
IL-8	21,26 $\pm$ 9,25	13,89 $\pm$ 13,87	0,028
TNF- $\alpha$	8,15 $\pm$ 10,6	3,57 $\pm$ 2,03	0,047
IL-6	16,95 $\pm$ 25,06	5,34 $\pm$ 5,45	0,038
MCP-1	1012,7 $\pm$ 286	629,7 $\pm$ 120	0,003



**Figura 15:** Niveles medios de citoquinas en suero ( expresados en pg/ml) en los pacientes con EPOC (estudio transversal).

## 2. Estudio de casos y controles

### 2.1 Características de los pacientes

En el estudio de casos y controles se incluyeron un total de 126 pacientes con EPOC, de ellos 42 eran sujetos colonizados por *P jirovecii* (casos) y 84 eran sujetos no colonizados (controles). Estos pacientes se parearon de forma que cada sujeto colonizado incluido en el estudio tenía como control dos pacientes con EPOC con el mismo rango de edad, sexo, hábito tabáquico, situación inmunológica y gravedad de la obstrucción espirométrica según la clasificación de la GOLD.

En la siguiente tabla se especifican los pacientes incluidos en función de los diferentes estadios de gravedad de la EPOC.

**Tabla 12:** Número de pacientes incluidos en el estudio de casos y controles, analizados según la gravedad de la obstrucción espirométrica (clasificación de la GOLD)

Estadio EPOC de la GOLD (VEF 1 %)	Sujetos colonizados (n)	Sujetos no colonizados (n)	Total de pacientes (n)
1 (80-100)	3	6	9
2 (50-80)	13	26	39
3 (30-50)	16	32	48
4 (0-30)	10	20	30

VEF 1%: flujo espiratorio forzado en el primer segundo

## 2.2. Respuesta inflamatoria sistémica

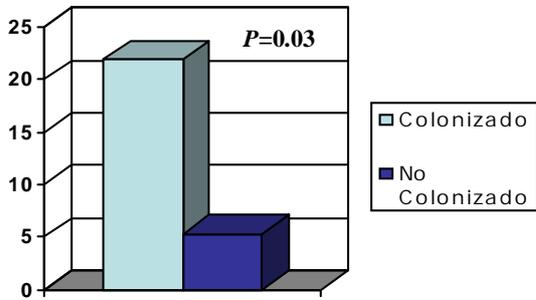
Con objeto de confirmar si las alteraciones en la respuesta inflamatoria sistémica observadas en el estudio transversal en los pacientes colonizados estaban en relación con la presencia de *Pneumocystis* y no con la propia evolución de la enfermedad, en este estudio de casos y controles se evaluó la respuesta inflamatoria sistémica existente en presencia o no de la colonización por el patógeno en sujetos con EPOC que presentaban una misma situación clínica.

Como se muestra en la tabla 13 y en la figura 16 los pacientes colonizados mostraron niveles séricos significativamente más elevados de IL-8, IL-6 y MCP-1 que los controles no colonizados. La concentración media de TNF- $\alpha$  en suero también fue más alta entre sujetos colonizados con valores cercanos a la significación estadística ( $p=0,069$ ).

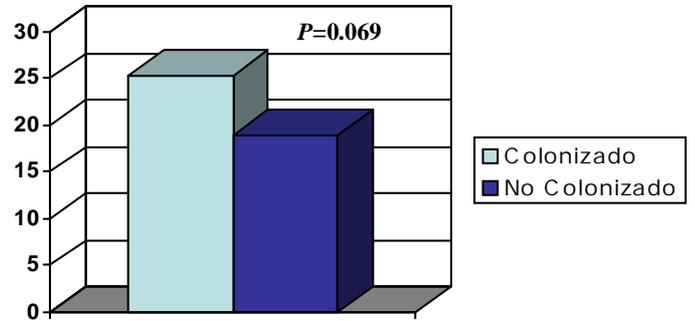
**Tabla 13:** Niveles de citoquinas en suero (media  $\pm$  desviación estándar) en los pacientes con EPOC (estudio de casos y controles)

Citoquinas (pg/ml)	Pacientes colonizados (n=42)	Pacientes no colonizados (n=84)	<i>p</i> (t-Student)
IL-8	21,9 $\pm$ 16,9	5,3 $\pm$ 10	0,003
TNF- $\alpha$	25,3 $\pm$ 17,1	19,0 $\pm$ 12,2	0,069
IL-6	9,8 $\pm$ 5,4	2,5 $\pm$ 6,2	0,016
MCP-1	802,5 $\pm$ 407	505,1 $\pm$ 295	0,01

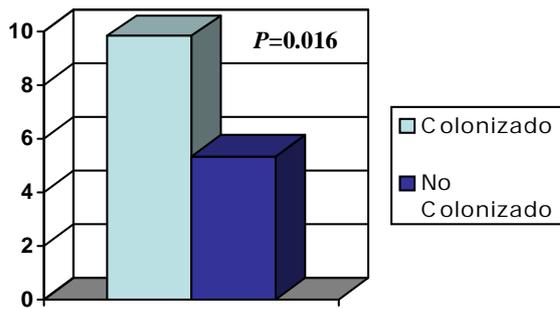
**IL-8**



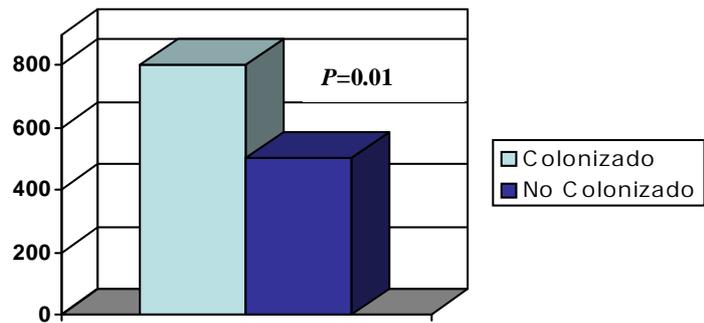
**TNF-alfa**



**IL-6**



**MCP-1**



**Figura 16:** Niveles medios de citoquinas en suero (pg/ml) en los pacientes con EPOC (estudio de casos y controles)



## **DISCUSIÓN**



Los resultados de este estudio permiten confirmar la alta prevalencia de colonización por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes con EPOC, concordante con la hipótesis de que estos pacientes pueden actuar como reservorio y fuente de infección.

Asimismo, el presente estudio pone en evidencia la alta tasa de exposición al patógeno mediante la detección de anticuerpos frente a *Pneumocystis* en pacientes colonizados con EPOC, siendo sensiblemente superior a la comunicada en otras cohortes de base comunitaria y nosocomial (Medrano et. al., 2003; Ludgren et. al., 1992).

Por otra parte, aporta información en cuanto a la colonización por *Pneumocystis jirovecii* y la gravedad de la obstrucción al flujo aéreo, observándose una elevada prevalencia de colonización por *P. jirovecii* en todos los estadios de la EPOC, con un incremento continuo aunque no significativo en la tasa de colonización según empeora la enfermedad.

El análisis molecular de los *loci* mtLSUrRNA y DHPS ha permitido conocer la distribución de genotipos del patógeno en pacientes con EPOC, que muestra un patrón similar al comunicado previamente en nuestra área en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas (Montes-Cano et. al., 2004). Por otro lado, en el presente estudio se detecta una baja presencia de mutaciones asociadas a resistencia a cotrimoxazol, en probable relación con el menor uso de estos fármacos para el tratamiento de infecciones en enfermos con patologías respiratorias crónicas.

Finalmente, el presente trabajo representa el primer estudio en el que se evalúa simultáneamente la respuesta inflamatoria local y sistémica en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica colonizados por *P. jirovecii* y sus resultados sugieren que el patógeno podría tener un importante papel en la patogenia de la EPOC.

## **1. Limitaciones**

Una de las posibles limitaciones de nuestro estudio podría estar en relación con la sensibilidad y especificidad de las técnicas diagnósticas empleadas para la detección de la colonización por *Pneumocystis*.

Las técnicas moleculares como la PCR, utilizadas en este estudio y en la mayoría de los estudios recientes sobre *P. jirovecii*, han demostrado ser más sensibles y específicas que los métodos de tinción (Durand-Joly et. al., 2005; Arcenas et. al., 2006). En concreto, la PCR *nested* empleada en este trabajo y que utiliza el gen mtLSU-rRNA como diana, es una técnica validada que ha demostrado en estudios comparativos tener la mayor sensibilidad para la detección de *P. jirovecii* (Robberts et. al., 2007). Dicha técnica, permite en la actualidad la detección de ADN de *P. jirovecii* procedente de muestras respiratorias obtenidas con métodos no invasivos y en muestras con baja carga de patógenos (Calderón et. al., 2009). Este hecho es importante a la hora de estudiar el fenómeno de la colonización por *Pneumocystis* en individuos no inmunocomprometidos, donde las muestras tienen una baja carga de microorganismos, como es el caso de nuestro estudio.

El principal inconveniente al usar este tipo de técnicas es la aparición de falsos positivos, fundamentalmente por problemas de contaminación. Sin embargo, en el presente estudio para evitar el riesgo de contaminación, durante el procesamiento de las muestras se tomaron medidas encaminadas a eliminar la posible presencia de ADN exógeno como pueden ser los amplicones de determinaciones anteriores. Para ello, la extracción de ADN y las fases de pre- y post-amplificación se realizaron en zonas de trabajo separadas espacialmente. Las superficies de trabajo se limpiaron antes y después de trabajar en ellas con soluciones específicas que destruyen el ADN. Asimismo, se usaron puntas con filtros y controles negativos (agua estéril) y positivos (muestras de pacientes con PcP diluidas 1:10) en todos los ensayos. Finalmente, la detección del ADN se realizó en dos loci diferentes, estrategia que también minimiza la posibilidad de aparición de falsos positivos.

Nuestro estudio en pacientes con EPOC muestra que el ADN de *P. jirovecii* puede ser detectado mediante técnicas sensibles de amplificación de ADN utilizando muestras biológicas obtenidas de forma no invasiva del tracto respiratorio, como el esputo de estos pacientes que, clínicamente, se caracterizan por ser expectoradores crónicos. Este hecho ya había sido documentado en trabajos previos publicados en los que se han empleado con éxito métodos basados en la PCR para estudiar el fenómeno de la colonización en muestras de lavados orofaríngeos, esputo y exudados nasofaríngeos. (Helweg-Larsen et. al., 1997; Flori et. al., 2004; Calderón et. Al, 2004; Medrano et. al., 2005; Durand-Joly et. al., 2005).

Por otra parte, podría plantearse si la detección de ADN del patógeno en muestras procedentes de las vías aéreas superiores es siempre indicativa de infección activa o colonización en el tejido pulmonar. En este sentido, actualmente, está aceptado que la detección de ADN en esputo en pacientes con signos clínicos y radiográficos de neumonía es suficiente para establecer el diagnóstico de PcP (Calderón et. al., 2011). Además, en modelos animales el uso de estas técnicas en muestras de secreciones respiratorias altas es un buen indicador de la presencia del microorganismo en los pulmones. (Oz & Hughes, 1999). En este sentido, hay modelos experimentales que muestran que los microorganismos de animales colonizados pueden replicarse en los alvéolos pulmonares de ratones inmunocompetentes, conservando su capacidad infectiva (Chabé et. al., 2004).

Otra posible limitación del estudio podría ser el uso en las técnicas serológicas de un extracto antigénico de *P. carinii* obtenido de ratas, ante la imposibilidad de utilizar antígeno de *P. jirovecii* humano por la ausencia de métodos de cultivo *in vitro* eficientes para obtener el microorganismo. En cualquier caso, esta limitación sería parcial, ya que en estudios previos se ha demostrado la especificidad de la técnica para valorar la respuesta inmune humoral en humanos al compartir ambos microorganismos un número significativo de antígenos (Gigliotti et. al., 1992).

Las técnicas de ELISA empleadas para la detección de interleuquinas inflamatorias se han realizado mediante pruebas comerciales estandarizadas, siendo los límites de detección los especificados por los fabricantes como se muestra en el apartado de material y métodos y en el anexo V. Además, la reproductibilidad de la técnica se confirmó por medidas repetidas de la misma muestra en días sucesivos, con repetición de los ensayos cuando los resultados de ambos ensayos no fueron coincidentes.

Por último, cabría plantearse si el tamaño y la distribución de los sujetos de estudio en la muestra evaluada puede limitar el alcance y la generalización de los resultados, sobre todo en lo que respecta a la estimación de la prevalencia de infección y exposición y su presencia en los diferentes estadios de la EPOC. En este sentido el tamaño muestral, difícil de determinar *a priori*, podría estar condicionando que, diferencias reales en las variables analizadas no adquirieran significación estadística. Sin embargo, podríamos considerar que el tamaño de la muestra analizada

es suficiente para obtener conclusiones en un estudio exploratorio como el desarrollado en presente trabajo.

Otro problema a considerar es que los pacientes con EPOC presentan habitualmente alteraciones inflamatorias que podrían dificultar la interpretación de los hallazgos, haciendo difícil conocer el papel real de la infección por *Pneumocystis* en este contexto. Para obviar en la medida de lo posible este hecho hemos diseñado un estudio comparativo entre sujetos con y sin dicha infección, en el que se analizan las posible alteraciones inducidas por *Pneumocystis* desde las perspectivas diversas (fenómenos locales y sistémicos) y se utilizan, además, dos aproximaciones metodológicas diferentes (corte transversal y estudio de casos y controles).

## **2. Prevalencia de colonización y exposición a *Pneumocystis***

La aplicación en las últimas décadas de técnicas diagnósticas moleculares basadas en el uso de PCR para la detección de ADN de *Pneumocystis* en muestras clínicas de sujetos con baja carga de patógenos ha posibilitado el estudio de la colonización por *P. jirovecii* en pacientes no inmunodeprimidos, y con distintas patologías respiratorias principalmente pacientes con EPOC.

Los resultados de nuestro estudio confirman la existencia de una elevada prevalencia (55,1%) de colonización por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes inmunocompetentes con EPOC y son concordantes con los hallazgos obtenidos en distintos estudios epidemiológicos realizados en población Europea y Norteamericana (tabla14).

**Tabla 14:** Sumario de estudios sobre prevalencia de colonización por *P. jirovecii* en pacientes con EPOC

<b>Autor, año</b>	<b>Tipo de población (n)</b>	<b>Técnica/muestra</b>	<b>% colonización</b>
Calderón, 1996	Síndrome bronquial crónico (50)	IHC/IF, esputo	10.0%
Sing, 1999	EPOC (50)	Nested PCR/BAL	37.5%
Probst, 2000	EPOC (37)	Nested PCR/BAL	40.5%
Helweg Larsen, 2002	Sospecha de neumonía bacteriana y EPOC (23)	Touch-down PCR /BAL, esputo, AB	43.5%
Maskell, 2003	EPOC sometidos a broncoscopia (23)	Nested PCR/BAL	17.4%
Calderón, 2004	EPOC (37)	Nested PCR/esputo	40.5%
Morris, 2004	Fumadores sometidos a cirugía pulmonar (68)	Nested PCR/ tejido pulmonar	36.7% (GOLD IV) 5.3% (GOLD 0-III)
Rivero, 2015	EPOC (58)	Nested PCR/esputo	55.1%

Abreviaturas: BAL, lavador broncoalveolar; IF, inmunofluorescencia; IHC, inmunohistoquímica; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; AB, aspirado bronquial

La proporción de sujetos con EPOC colonizados en la mayoría de los estudios es elevada, aunque las tasas de prevalencia son muy variables según las técnicas diagnósticas utilizadas y el área geográfica evaluada. Respecto al primer aspecto, la prevalencia de colonización que encontramos en nuestro estudio es mucho más elevada que la observada inicialmente en nuestra área, en un estudio en el que utilizando técnicas convencionales de microscopía con inmunofluorescencia se demostró la existencia del patógeno en el 10% de las muestras de pacientes con bronquitis crónica (Calderón et. al., 1996).

De hecho, la tasa de colonización encontrada por los mismos autores en un trabajo posterior en el que se evaluaron mediante PCR muestras de 37 pacientes con bronquitis crónica de nuestro entorno fue del 40.5% (Calderón et. al. 2004), cifra solo ligeramente inferior a la detectada en el presente estudio lo que podría estar en relación con la menor gravedad de la EPOC de los pacientes (VEF1% medio del 60% en el estudio inicial frente al 45% en los sujetos del presente análisis).

En Europa dos estudios realizados a finales del siglo pasado en Alemania en el que se que se evalúan por PCR muestras de lavado bronco-alveolar en pacientes con EPOC encuentran cifras de prevalencia en torno al 40% (Sing et. al. 1999; Probst et. al. 2000). En otro estudio realizado en Dinamarca en el que se analizan muestras respiratorias diversas de pacientes sin infección por el VIH que ingresan por neumonías bacterianas también se encuentra una prevalencia de colonización del 43.5% en el subgrupo de pacientes con EPOC evaluados (Helweg-Larsen et. al., 2002).

En Estados Unidos en un estudio posterior, Morris y cols. examinan la prevalencia de colonización en pacientes sometidos a trasplante pulmonar por EPOC grave (Morris et. al., 2004). Analizando mediante PCR en el tejido pulmonar nativo obtenido tras el trasplante encuentran que un 37% de los pacientes con EPOC muy grave estaban colonizados por *Pneumocystis* frente a sólo un 9% de los pacientes con EPOC en estadios 0 al 3 de la clasificación de la GOLD. En el análisis multivariante el diagnóstico de EPOC fue el único predictor de colonización (*odds ratio* (OR)=7,3, intervalo de confianza (IC) 95% [2.4-22.4],  $p<0.001$ ). Otras características clínicas tales como la edad, el uso de esteroides o cotrimoxazol no estaban relacionadas con el riesgo de colonización. Sin embargo, este estudio tiene algunas limitaciones en lo que respecta al análisis de la prevalencia de colonización por estadios de la EPOC, ya que mientras la presencia del patógeno en pacientes con EPOC muy grave (trasplantados) se evaluó en muestras de pulmón obtenido del receptor, en los sujetos en estadios 0 a 3 se realizó en muestras de biopsias donde la carga *Pneumocystis* podría ser menor.

No todos los estudios han encontrado la misma asociación entre colonización y EPOC, de este modo Maskell y cols. hallaron que la colonización por el patógeno estaba relacionada con el uso de esteroides y no con la enfermedad, aunque este estudio se realizó en pacientes con un grado leve de obstrucción de la vía aérea, en los cuales parece menos probable la colonización (Maskell et. al., 2003).

Por otra parte, la asociación entre colonización por *Pneumocystis* y enfermedades respiratorias no solo se circunscribe al ámbito de la EPOC, sino que ha sido descrita en otros procesos pulmonares. En este sentido, Probst y colaboradores analizaron 141 pacientes con bronquitis crónica, fibrosis quística y cáncer de pulmón, encontrando que globalmente más del 21% de los pacientes estaban colonizados

(Probst et. al., 2000). Este resultado concuerda con los datos aportados por un estudio similar realizado en población española, donde se observa una prevalencia de colonización del 27% (Montes-Cano et. al., 2004). La prevalencia en otros estudios publicados donde se incluyen pacientes con enfermedades pulmonares agudas o crónicas varía desde el 2,6% al 35% (Sing et. al., 1999; Visconti et. al., 2000; Matos et. al., 2003b), aunque invariablemente son los sujetos con EPOC los que muestran una mayor frecuencia de colonización. Así, por ejemplo, en pacientes con fibrosis quística los estudios realizados en diferentes países europeos basados en técnicas moleculares han mostrado prevalencias entre el 7,4% y el 20,6% (Sing et. al., 2001; Respaldiza et. al., 2005; Hernández-Hernández et. al, 2012).

En cuanto a las diferencias geográficas, en el estudio más amplio realizado hasta la fecha en pacientes con EPOC (proyecto Eurocarinii) en el que se incluyeron un total de 560 pacientes con EPOC no seleccionados y 543 controles de siete países europeos, se objetivó una elevada prevalencia de colonización con cifras que oscilaban entre el 7 y 41% según los diferentes centros, lo que permitió identificar áreas de alto y bajo riesgo para esta infección (Calderón et. al., 2006).

Se ha especulado que estas variaciones geográficas podrían estar en relación con factores climáticos, hipótesis que esta apoyada por varias observaciones epidemiológicas. En primer lugar, por la existencia también de importantes variaciones geográficas en la incidencia de PcP en Europa, con un gradiente norte-sur en el cual los países de clima más frío (Dinamarca, Irlanda, Finlandia, norte de Alemania, Países Bajos, Suecia y Reino Unido) tienen una incidencia de PcP como primer evento definitorio de SIDA del 49,8%, mientras que en los del Sur (Grecia, Israel, Italia, España y Portugal) las tasas de incidencia son considerablemente menores, en torno al 25%. (Blaxhult et. al., 2000). Por otra parte, en estudio descriptivo amplio sobre la epidemiología de la PcP en el sur de España se observó la existencia de un patrón estacional con un número significativamente mayor de casos en invierno, siendo la temperatura mínima media el principal factor meteorológico relacionado con la infección por este patógeno (Varela et. al., 2004).

Respecto a la tasa de exposición al patógeno, la información disponible es escasa y solo existe un estudio previo en el que se haya evaluado específicamente este problema en pacientes con EPOC, en el que se observa una correlación inversa entre

la presencia de anticuerpos específicos frente al patógeno y la gravedad de la EPOC (Morris et. al., 2008a). Por otra parte, en un modelo experimental en primates con infección por SIV se ha demostrado que existe una correlación inversa entre la presencia de una respuesta humoral específica frente al patógeno y el desarrollo de EPOC (Kling et. al., 2010).

La prevalencia de anticuerpos frente a *Pneumocystis* observados en nuestro estudio se encuentra dentro del rango del 50-80% observado en otros estudios de seroprevalencia realizados en diferentes cohortes de pacientes con infección por el VIH y en población general, en distintas áreas geográficas de Europa (Ludgren et. al., 1993; Medrano et. al., 2003), Norteamérica (Pegrob et. al., 1990) y Africa (Nkinin et. al., 2009).

En cualquier caso las técnicas serológicas empleadas en los diferentes estudios publicados son muy heterogéneas, y por tanto podrían explicar las diferencias de prevalencia halladas. Además, es probable que el grado de exposición sea distinto entre las diferentes zonas geográficas, reflejo de las diferencias encontradas en la prevalencia de infección entre las mismas. De este modo, los resultados comunicados en cuanto a tasas de exposición a *Pneumocystis* son heterogéneos en distintos estudios a pesar de la aplicación de la misma técnica (Respaldiza et. al., 2004, Daly et. al., 2009).

El porcentaje de anticuerpos hallado en nuestro estudio (81%) es sensiblemente superior a la tasa de exposición en población general, comunicada en un estudio previo de base comunitaria realizado previamente en nuestro área que utilizando la misma técnica fue del 58.2% (Medrano et. al., 2003) y a la observada en otro estudio de base hospitalaria en el Norte de Europa (Ludgren et. al., 1992).

En definitiva el presente estudio confirma la existencia de una elevada prevalencia de colonización y exposición a *Pneumocystis* en pacientes con EPOC en nuestra área.

Estos hallazgos podrían tener importantes implicaciones para la salud pública por varias razones: a) La colonización por *P. jirovecii* podría estar implicada en la progresión de la EPOC a través de una respuesta inflamatoria crónica inducida por el patógeno y b) Los pacientes con EPOC que son expectoradores habituales podrían

constituirse como reservorio de *Pneumocystis* y fuente de la infección para enfermos inmunocomprometidos susceptibles de padecer una neumonía por este patógeno.

Este hecho podría ser de particular importancia en hospitales donde es común la presencia de ambos sujetos, pacientes con EPOC y pacientes inmunodeprimidos hospitalizados en las mismas áreas.

De todos modos nuevos estudios serían necesarios para determinar el significado clínico y la relevancia epidemiológica de estos hallazgos.

### **3. Colonización por *Pneumocystis* y gravedad de la EPOC**

Una de las piezas claves que ponen en evidencia la relación entre la colonización por *Pneumocystis* y la progresión de la EPOC es la correlación observada entre la colonización y la gravedad de la enfermedad (Morris et. al., 2004).

Así, en un estudio en pacientes con EPOC no infectados por el VIH, se ha demostrado que la presencia de este microorganismo es un factor de riesgo para un mayor grado de obstrucción espirométrica de la EPOC, independientemente del uso de corticoides o el hábito tabáquico. (Morris et. al., 2004). En este estudio Morris y cols. analizaron la tasa de colonización por *Pneumocystis* en muestras pulmonares de pacientes fumadores con distintos grados de obstrucción al flujo aéreo según los estadios de la GOLD. Los sujetos colonizados tenían un valor significativamente menor del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF1), y la colonización era más común en los estadios avanzados de la EPOC. De esta forma, hasta un tercio de los pacientes (36.7%) con EPOC muy grave (estadio 4 de la GOLD) estaban colonizados, comparados con un 5.3% de tasa de colonización en los pacientes de los grupos de menor gravedad (estadios 0 a 3 de la GOLD).

Por otra parte, también se ha demostrado que la neumonía por *Pneumocystis jirovecii* produce un empeoramiento sostenido de la función pulmonar. En un estudio realizado en individuos con infección por el VIH, se observó que los que tenían antecedentes de PcP mostraban una obstrucción al flujo aéreo más intensa que los pacientes que no habían presentado neumonía por el microorganismo (Crothers et. al., 2006). Morris y cols. estudiaron una cohorte de 1149 pacientes con infección VIH

seguidos durante una media de 3,7 años y objetivaron una pérdida anual media de CVF de 71,4 ml y de VEF1 de 39,4 ml tras un episodio de neumonía por *P. jirovecii* (Morris et. al., 2000).

En nuestro estudio existió una elevada prevalencia de colonización por *P. jirovecii* en todos los estadios de la EPOC y se observó que los pacientes con mayor grado de obstrucción espirométrica tenían a su vez una mayor prevalencia, con un incremento continuo en la tasa de colonización conforme empeoraba la enfermedad (44,4% en el estadio 1 de la GOLD, 46,1% en el estadio 2, 58,3% en el estadio 3 y 66,6% en el estadio 4), aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística. Por otra parte, en el presente estudio los pacientes colonizados mostraron un VEF1 menor que los no colonizados (42,2 vs. 47,7) aunque, de nuevo, sin diferencias estadísticamente significativas. La ausencia de asociación entre colonización y gravedad de la EPOC observada en presente estudio podría estar en relación con un problema de potencia estadística y, en este sentido, sería necesario aumentar el tamaño muestral para obtener conclusiones definitivas sobre este último aspecto.

Sin embargo, la población evaluada si era muy homogénea, ya que todos los sujetos incluidos estaban en una situación estable respecto a su EPOC, descartándose la presencia de co-infecciones bacterianas mediante cultivo de esputo, aunque una posible limitación de nuestro estudio es que no se analizaron otras variables que pudieran influir en la gravedad de la EPOC, como la presencia de otras comorbilidades o la cuantificación del consumo de tabaco.

En cualquier caso, todos los estudios realizados hasta la fecha en pacientes con EPOC son análisis transversales que, aunque globalmente sugieren que *P. jirovecii* podría tener un papel en la progresión de la EPOC, no permiten por su diseño demostrar una relación causa-efecto. En este sentido, dos estudios longitudinales realizados en modelos animales sugieren fuertemente una asociación entre la presencia del patógeno y la progresión de la enfermedad. El primero de ellos, realizado en un modelo de ratones no inmunodeprimidos demostró que los animales expuestos al humo del tabaco y colonizados por *Pneumocystis* desarrollaban enfisema mas frecuentemente que los expuestos a una sola de estas dos variables (Christensen et. al, 2008). En el segundo, realizado en primates con infección por el SIV/VIH,

mostró que los simios colonizados por *Pneumocystis* sufrían un declive progresivo de la función pulmonar (Shipley et. al. 2010)

#### **4. Distribución de genotipos**

En el presente estudio se describe el patrón de genotipos de *P. jirovecii* aislados en muestras respiratorias de pacientes con EPOC de nuestro área. Este patrón se caracteriza por un predominio de los genotipos 3 (85T/248C) en el locus mt LSU rRNA y silvestre (76.9%) en el locus de la DHPS y por la presencia de polimorfismos en el gen de la DHPS asociados a resistencia a sulfamidas en más del 20% de los casos evaluados.

Hasta fechas recientes debido a la ausencia de un método de cultivo *in vitro* para *P. jirovecii*, las posibilidades de conocer en profundidad la biología básica y la epidemiología del microorganismo eran realmente escasas. Sin embargo la identificación de varios genes han permitido el análisis y la caracterización de las variantes de *P. jirovecii* presentes en las diferentes poblaciones humanas.

De esta forma, el estudio de dos locus diferentes como son el gen de la subunidad mayor mitocondrial del ribosoma (mt LSUrRNA), implicado en funciones básicas metabólicas del patógeno y el gen que codifica la dihidropteroato sintetasa, (DHPS), diana de acción de las sulfamidas, fármaco de elección en el tratamiento y la profilaxis de la neumonía por *Pneumocystis*, ha permitido ampliar la información existente sobre la epidemiología del microorganismo.

Hasta hace poco, el patrón de variabilidad genética de *Pneumocystis* aislados de pacientes no inmunocomprometidos y colonizados por el patógeno no era conocido. Los estudios de epidemiología molecular realizados en este sentido han permitido conocer la distribución de genotipos de *Pneumocystis* en grupos de pacientes específicos como son los enfermos con EPOC. La comparación de diferentes patrones observados puede proporcionar información sobre ciclos de infección de los microorganismos en diferentes ecosistemas humanos, así como sus mecanismos y fuentes de transmisión.

En 2004 nuestro grupo publica el primer estudio epidemiológico realizado en España en el que se analizan los genotipos de *P. jirovecii* aislados de muestras respiratorias en sujetos con diferentes enfermedades respiratorias crónicas (EPOC, fibrosis quística, neumopatías intersticiales) y pacientes con SIDA y PcP, basándose en dos *loci*: el gen mt LSU rRNA y el gen DHPS.

Respecto al gen mt LSU rRNA, el genotipo mayoritario en ambos grupos fue el tipo 1(85C/248C), con una frecuencia mayor en los sujetos con PcP y SIDA (73,3% vs. 43,7%,  $p=0,03$ ). El genotipo 3 fue más frecuentemente observado en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas que en aquellos con SIDA y PcP (40,6% vs. 20%,  $p=0,13$ ), el genotipo 2 fué el menos frecuente, alcanzando un rango similar en los dos grupos de pacientes (10,9% vs. 6,6%) y no se identificaron pacientes con genotipo 4. Finalmente las mezclas de genotipos solo se encontraron en el grupo de pacientes con patología crónica pulmonar (Montes-Cano et. al., 2004).

En un estudio epidemiológico realizado previamente en Estados Unidos en muestras de pacientes con SIDA y PcP (Beard et. al., 2000) en el que analizan el genotipo mitocondrial, se describe una elevada frecuencia tanto del genotipo 1 como del 2 en proporciones similares (38 y 36.7%, respectivamente), frente al 3 (9.3%), existiendo por lo tanto una clara inversión entre el genotipo 2 y el 3 cuando lo comparamos con el estudio realizado en nuestra área.

En el presente estudio, el genotipo de la región mitocondrial mt LSU rRNA que predomina en pacientes con EPOC es el genotipo 3, en el 56.6% de los sujetos colonizados, frente al genotipo 1 en el 26.6%, el genotipo 2 en el 10% y la coinfección por mezcla de genotipos en el 6.6% de nuestros pacientes. La distribución de genotipos observada es similar a la descrita previamente en nuestro área en pacientes con diferentes patologías pulmonares crónicas, aunque se observa una mayor proporción de sujetos colonizados con genotipo 3 y una menor presencia del genotipo 1, hallazgos que podrían estar en relación con diferencias en las poblaciones analizadas (pacientes con EPOC en el presente estudio y con distintas patologías pulmonares crónicas en el previo) o con el bajo número de muestras analizadas.

El hallazgo en diferentes estudios del mismo área geográfica de un patrón de genotipos similar entre los pacientes colonizados con enfermedades respiratorias crónicas, sugiere la posibilidad de una fuente común de infección y que los pacientes

con EPOC que están colonizados por el patógeno, que frecuentemente son expectoradores crónicos, podrían actuar como reservorio y fuente de infección para otros sujetos.

En cuanto al análisis de las mutaciones descritas en el gen DHPS, el genotipo silvestre es el que predomina en nuestros pacientes con EPOC (76.9%), mientras que los genotipos 2 y 3 aparecen sólo en dos pacientes.

En nuestro estudio, se pudieron amplificar mediante PCR fragmentos del gen de la DHPS en 13 de los 32 pacientes colonizados lo que supone una tasa de amplificación del 40,1%. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios realizados en sujetos colonizados con rangos que oscilan entre el 31% (Montes-Cano et. al., 2004) y el 53% (Calderón et. al., 2004). Estos bajos porcentajes de amplificación podrían explicarse por la baja carga del patógeno en pacientes colonizados que escaparía a la resolución de una técnica (*Touch down*) menos sensible que la PCR anidada y cuya diana es, además un gen unicopia. No sucede así en los estudios previos realizados en pacientes con SIDA y neumonía por *P. jirovecii* donde la proporción de muestras amplificadas es mucho mayor en relación directa con la carga más elevada de *Pneumocystis* aislado en las muestras respiratorias. (Helweg-Larsen et. al., 1999).

Respecto al patrón de genotipos en el gen DHPS, los resultados del presente estudio son similares a los comunicados en un trabajo previo realizado en nuestro medio en el que se incluyeron 50 sujetos colonizados sin PcP con diferentes patologías pulmonares, así como 25 pacientes con PcP. En este estudio el genotipo silvestre predominó en ambos grupos de pacientes (78% en colonizados frente a un 60% en PcP,  $p=0.17$ ) (Friaiza et. al., 2010).

El desarrollo de mutaciones en este gen ha sido relacionado con el empleo previo y la duración de la quimioprofilaxis con cotrimoxazol o dapsona (Kazanjian et. al., 1998). En España el uso del trimetropin-sulfametoxazol está indicado de forma estandarizada en pacientes con infección por el VIH como profilaxis de la PcP, sin embargo su prescripción es rara en el tratamiento de patologías respiratorias. Este hecho podría explicar la relativa baja tasa de mutaciones en la DHPS asociadas a resistencia a sulfamidas observada en el presente estudio en comparación con la observada en pacientes con PcP (Huang et. al., 2000).

Por otro lado, el estudio del gen de la DHPS que está relacionado con la resistencia a sulfamidas, ha sido seleccionado como un marcador de mutación lo que podría permitir obtener información sobre la vía de transmisión en estos pacientes. Así la constatación de cepas de *P. jirovecii* con mutaciones en la DHPS en pacientes que no habían tomado previamente derivados de las sulfamidas, indicaría la posibilidad de transmisión de estas cepas mutantes desde sujetos que emplean frecuentemente quimioprofilaxis con cotrimoxazol (Calderón et al., 2004; Huang et al., 2000; Hauser et al., 2010), o bien la existencia de mutaciones espontáneas, fenómeno que es poco probable dada la estabilidad genética del locus DHPS (Lane et al., 1997; Kazanjia et al., 1998). De este modo, una de las hipótesis más verosímiles para explicar el origen de las mutaciones es la transmisión de cepas del patógeno con mutaciones desde pacientes con PcP tratados con sulfamidas a estos individuos colonizados.

En cualquier caso, la presencia de mutaciones en el gen de la DHPS asociadas a resistencia a cotrimoxazol se observó en el 23% de nuestros pacientes con EPOC, que, por su condición de expectoradores crónicos, podrían representar una muy probable fuente de transmisión de cepas con mutaciones a pacientes inmunodeprimidos en riesgo de desarrollar PcP. Además la identificación de estas mutaciones podría constituir un criterio más para guiar al clínico en el tratamiento de la infección por *P. jirovecii*, aunque son necesarios estudios más amplios que definan mejor el papel real de la determinación de estas mutaciones en la práctica clínica.

## **5. Respuesta inflamatoria en pacientes colonizados**

La elevada prevalencia de colonización por *Pneumocystis* en pacientes con EPOC descrita en la literatura (Maskell et al., 2003; Calderón et al., 2004; Morris et al., 2004), ha generado un gran interés por conocer el posible papel del microorganismo en la patogenia de esta enfermedad. Es probable que *Pneumocystis* en estos pacientes no actúe como un mero espectador, sino que tenga un importante papel en el mantenimiento y progresión de la enfermedad.

Los resultados de nuestro estudio avalan la hipótesis de que la colonización por *P. jirovecii* en pacientes con EPOC podría condicionar cambios en el sistema

inmunitario del huésped caracterizados por una activación de la respuesta inflamatoria. Nuestros resultados muestran que los pacientes con EPOC colonizados por *Pneumocystis* tienen un aumento de citoquinas inflamatorias tanto a nivel local (IL-8 y MCP-1) como sistémico (IL-8, IL-6, TNF-  $\alpha$  y MCP-1).

Cada vez existen más evidencias que apoyan la hipótesis de que las alteraciones inflamatorias constituyen uno de los mecanismos fisiopatológicos más importantes para el desarrollo y progresión de las enfermedades pulmonares crónicas como es el caso de la EPOC (Wouters et. al., 2005).

Es comúnmente conocido que el humo del tabaco es el factor inicial que desencadena la cascada inflamatoria en la EPOC. Sin embargo, hay fumadores con distinto grado de inflamación y exfumadores que tienen una inflamación persistente, que no se atenúa a pesar de cesar en su hábito e incluso que sufren una progresión en el grado de obstrucción de la vía aérea. Estos hallazgos sugieren que existen otros factores que incrementan o mantienen el proceso inflamatorio crónico una vez se ha establecido (Barnes et. al., 2000).

En este sentido, se ha formulado la hipótesis de que sean microorganismos los que perpetúen la inflamación y la destrucción pulmonar. Así, la colonización bacteriana en pacientes con EPOC ha sido relacionada con elevación de cifras de IL-8 y TNF-  $\alpha$  en esputo y LBA de estos pacientes, además de con un mayor grado de obstrucción de la vía aérea (Patel et. al., 2002; Patel et. al., 2004).

También las infecciones víricas han sido implicadas en la patogenia de la EPOC, tanto en situación estable de la enfermedad como en las reagudizaciones, interviniendo en la progresión de la misma a través de la inflamación pulmonar (Rhode et. al, 2003). Así, se ha demostrado que el virus de la *influenza* aumenta los niveles de citoquinas proinflamatorias en las células epiteliales bronquiales de estos pacientes (Matsukura et. al., 1996)

Diferentes estudios permiten plantear la idea de que *Pneumocystis* podría formar parte de la hipótesis del círculo vicioso, en la cual la colonización por distintos microorganismos perpetúa una respuesta inflamatoria y de remodelación pulmonar en los sujetos con EPOC (Morris et. al., 2012).

En modelos animales, se ha demostrado que incluso a baja carga *Pneumocystis* se acompaña de cambios anatómicos y fisiológicos. Se ha descrito la existencia de alteraciones en la membrana alveolo-capilar, seguidas por cambios degenerativos en los neumocitos tipo I, hipertrofia reparadora de los neumocitos tipo II y daño alveolar difuso, que conducen a la fibrosis pulmonar. La colonización por *P. jirovecii* induce una respuesta inflamatoria asociada a cambios en la función pulmonar y en la arquitectura pulmonar similares a los observados en el enfisema. Estas alteraciones dependen de la capacidad de *Pneumocystis*, demostrada en modelos animales, de inducir en fases muy tempranas de la infección, la activación de los macrófagos alveolares y la elevación de las citoquinas proinflamatorias. (Norris et. al., 2006; Prevost et. al., 1998).

Así se ha demostrado, en modelos experimentales, que la PcP provoca una marcada respuesta inflamatoria caracterizada por un incremento en el número de neutrófilos y linfocitos T (principalmente CD8+) en el bronquio y el tejido pulmonar, así como un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias como IFN gamma, TNF- $\alpha$  e IL-8 (Wright et. al., 1997).

Hasta la fecha, con la excepción de un trabajo preliminar de nuestro grupo (Calderón et. al., 2007) y de un estudio publicado recientemente (Morris et. al., 2014), la evidencia disponible en la EPOC sobre el efecto de *Pneumocystis* en el huésped inmunocompetente, se basa en estudios en modelos animales y a la extrapolación de los resultados de las investigaciones realizadas en sujetos inmunocomprometidos con PcP. En la tabla 15 se muestran los estudios disponibles que centrados en la EPOC analizan la interacción entre *Pneumocystis*-sistema inmune en diferentes hospedadores, incluido el hombre.

**Tabla 15:** Sumario de estudios sobre respuesta inmune frente a *Pneumocystis* y EPOC

Evidencia	Modelo	Referencia
Desarrollo de alteraciones similares a la EPOC tras PcP	Hombre	Morris AM, Huang L, Bacchetti P; Am J Respir Crit Care Med 2000;162: 612-6
Similar respuesta inmune en primates infectados con SIV colonizados por <i>Pneumocystis</i> y con PcP	Monos	Patil SP, Board KF, Lebedeva IP; J Eukaryot Microbiol 2003; 50 (suppl): 661-2.
Aumento de linfocitos en pacientes con EPOC colonizados por <i>Pneumocystis</i>	Hombre	Varela JM, Respaldiza N, Sánchez B; J Eukaryot Microbiol 2003; 50 (suppl): 672-3.
Correlación entre tasa de colonización por <i>Pneumocystis</i> y gravedad de la EPOC	Hombre	Morris A, Sciruba FC, Lebedeva IP; Am J Respir Crit Care Med 2004; 170: 408-13.
Desarrollo de progresiva obstrucción y declive de la función pulmonar en monos con infección SIV colonizados por <i>Pneumocystis</i>	Monos	Norris KA, Morris A, Patil S; Immunol Res 2006; 36: 175-87.
Aumento sistémico de citoquinas inflamatorias en pacientes con EPOC colonizados por <i>Pneumocystis</i>	Hombre	Calderón EJ, Rivero L, Respaldiza N; Clin Infect Dis 2007; 45:e17-9.
Desarrollo acelerado de enfisema en animales colonizados expuestos al humo del tabaco	Ratones	Christensen PJ, Preston AM, Ling T; Infect Immun 2008; 76: 3481-90.
Aumento de la obstrucción bronquial en pacientes con infección por VIH colonizados por <i>Pneumocystis</i>	Hombre	Morris A, Alexander T, Radhi S; J Clin Microbiol. 2009; 47(11):3773-6.
Desarrollo de enfisema y declive de la función pulmonar en un modelo de primates con SIV colonizados por <i>Pneumocystis</i>	Monos	Shipley TW, Kling HM, Morris A; J Infect Dis. 2010;15;202(2):302-12.
Aumento de la expresión de genes vinculados a la respuesta inflamatoria Th1 en EPOC	Hombre	Fitzpatrick ME, Tedrow JR, Hillenbrand ME ; Microbiol Immunol 2014; 58: 202-211.

PcP, neumonía por *Pneumocystis*; EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica; SIV, virus de la inmunodeficiencia del simio

En un modelo de *macaco rhesus* colonizado por *Pneumocystis* se ha descrito que la respuesta inflamatoria es similar a la que aparece en los casos de PcP (Patil et. al., 2003). En este estudio los autores examinan la respuesta inmune local que se induce tras la colonización por *Pneumocystis* en monos infectados con el virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV), los cuales fueron inoculados intrabronquialmente

con *Pneumocystis*, analizándose la composición celular y los niveles de citoquinas en el lavado broncoalveolar. El estudio mostró que ciertos simios desarrollaban una PcP mientras que otros permanecían en un estado de portador. Tras la inoculación había un marcado aumento de linfocitos T CD8+ y neutrófilos. Además la infiltración por estas células persistía en el tiempo y estaban aumentados los niveles de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-8 incluso durante la colonización.

En un estudio experimental posterior, cuyo objetivo fue analizar el efecto en la función pulmonar de la colonización por *Pneumocystis* tomando también como modelo monos infectados con el SIV, se demuestra que el patógeno condiciona la aparición de una enfermedad pulmonar crónica y progresiva en los animales, caracterizada por un aumento de las áreas de enfisema (medido por tomografía axial computerizada), un incremento de los niveles de citoquinas proinflamatorias en el lavado broncoalveolar y el deterioro de la función pulmonar (Shipley et. al., 2010).

En otro modelo animal de ratones inmunocompetentes, sometidos al humo del tabaco y a la infección por *Pneumocystis murina*, se detectan alteraciones similares al enfisema pulmonar, demostrando además que la exposición al humo del cigarrillo aumenta significativamente la carga de este organismo en el pulmón y que la presencia de ambos factores aceleran el desarrollo de enfisema (Christensen et. al., 2008).

Finalmente, en el único estudio realizado en humanos con EPOC, se detecta un aumento en la expresión de genes que codifican la respuesta Th1 en muestras pulmonares de pacientes colonizados por *Pneumocystis* (Fitzpatrick, et. al., 2014).

Los resultados de los dos diseños metodológicos que hemos seguido en este estudio muestran que la colonización por *Pneumocystis* induce de manera significativa un aumento de la respuesta inflamatoria sistémica en sujetos con EPOC que podría ser debida a una inducción de la proteína MCP-1 segregada por los macrófagos y que favorecen una activación de la respuesta inmune y una liberación de mediadores inflamatorios como la IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ . Estos mediadores están también aumentados de manera significativa a nivel sistémico en nuestros sujetos con EPOC colonizados.

Así, aunque estas diferentes células y citoquinas implicadas en la respuesta inmunitaria frente a *Pneumocystis* tienen un papel clave en el control de la infección, la intensidad y la persistencia de esta respuesta inflamatoria secundaria a la colonización por el patógeno puede condicionar la aparición de daño tisular irreversible e incluso comprometer la función pulmonar.

Estudios realizados en animales y humanos sugieren que el microorganismo podría estar relacionado con la progresión de la EPOC. Así, en una población inmunocompetente, se ha demostrado que la colonización es un factor de riesgo para una mayor gravedad en la EPOC, independiente del hábito tabáquico o del uso de corticosteroides (Morris et. al., 2004). En una población infectada por el VIH, la colonización por *Pneumocystis* se asoció con un mayor riesgo de obstrucción de las vías respiratorias (*Odds Ratio* de 8,8) (Morris et. al., 2009). Este efecto se asoció con un aumento de los niveles pulmonares de metaloproteasa de matriz 12, una proteasa que ha sido implicada en la patogénesis de la EPOC (Chung et. al., 2001; Finlay et. al., 1997; Mole et. al., 2005).

Por otra parte, estudios *in vitro* han demostrado la capacidad del antígeno mayor de superficie (MSG) de *Pneumocystis* de inducir la producción de IL-8 y MCP-1 (del inglés *Monocyte chemoattractant protein-1*) por parte de las células epiteliales alveolares humanas (Coleman et. al., 1984; Benfield et. al., 1999).

La respuesta adaptativa del huésped a la infección por *Pneumocystis* incluye la activación de macrófagos alveolares, células dendríticas y neutrófilos, que liberan diferentes citoquinas y promueven la eliminación del mismo.

Adicionalmente, las células T CD4<sup>+</sup> tienen también un importante papel en el control de la infección por *Pneumocystis*, de tal modo que su descenso en individuos infectados con VIH se asocia a un mayor riesgo de desarrollo de PcP (Phair et. al., 1990). La introducción de la terapia antirretroviral y la reconstitución en los niveles de células T CD4<sup>+</sup> han reducido drásticamente la frecuencia de la PcP en individuos con infección por el VIH, lo que demuestra la importancia de los niveles de células T CD4<sup>+</sup> en la prevención y control de la infección por *Pneumocystis* (Kaplan et. al., 2000). Esta correlación inversa entre los niveles de células T CD4<sup>+</sup> y la susceptibilidad a la PcP ha sido también observada en pacientes no infectados sin

infección por el VIH que reciben tratamiento inmunosupresor post trasplante o después de la quimioterapia para los tumores malignos (Mansharamani et. al., 2000).

Aunque el nivel de células T CD4+ se correlaciona con el control de la infección por *Pneumocystis*, el mecanismo fisiopatológico por el cual estas células contribuyen a la eliminación del organismo es incierto. Varios estudios han tratado de examinar el papel de las subpoblaciones T *helper* en el control de la infección por *Pneumocystis*. Shellito y colaboradores analizan el reclutamiento de linfocitos Th1 y Th2 al pulmón tras una infección experimental por *Pneumocystis* en ratones y encontraron un incremento de ambas subpoblaciones. Sin embargo, detectaron unos niveles mayores de las células Th2 (Shellito et. al., 2000). Del mismo modo, una respuesta mixta Th1 y Th2 se observó en fases iniciales de la infección tras la inoculación de *Pneumocystis* en un modelo de macacos infectados por el SIV (Shipley et. al., 2010). En este estudio existía un aumento de los niveles de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5, e IL-13) en el lavado broncoalveolar de los animales colonizados por *Pneumocystis* en comparación con los monos infectados solo con SIV, mientras que los niveles de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y TNF- $\alpha$  se incrementaron solo transitoriamente tras la colonización. En conjunto, estos estudios indicarían que es necesaria una señalización óptima de células T CD4+ para el control de la infección por *Pneumocystis*.

Los datos obtenidos en nuestro estudio mostraron un aumento cercano a la significación estadística en los niveles de citoquinas IL-8 y MCP-1, pero no de los niveles de TNF- $\alpha$  en el esputo de los pacientes con EPOC colonizados, sugiriendo la existencia de un aumento de la respuesta inflamatoria a nivel local.

Mientras que el papel de las células T CD4+ en el control de la infección por *Pneumocystis* es clara, la contribución de los linfocitos T CD8+ es más controvertida principalmente en situaciones de depleción de células T CD4+. En un modelo de infección por *Pneumocystis* en ratones con déficit de células T CD4+ el acúmulo de CD8+ en el pulmón no es suficiente para el control de la infección (Beck et. al., 1991). En otro modelo de VIH y coinfección por *Pneumocystis*, en primates infectados, la colonización por el microorganismo determinó una acumulación significativa de células T CD8+ en el LBA en comparación con los animales SIV sin

*Pneumocystis*; sin embargo, el reclutamiento de células T CD8+ en los pulmones no permitió conseguir el aclaramiento completo de la infección (Croix et. al., 2002).

En contraste existen otras evidencias que sugieren que las células T CD8+ pueden contribuir a una respuesta protectora contra la infección por *Pneumocystis*, particularmente en el contexto de la inmunosupresión (Beck et. al., 1996).

En este sentido, Kolls y colaboradores han demostrado que el IFN- $\gamma$  es uno de los factores que se asocian al reclutamiento de células T CD8 + (Kolls et. al., 1999). Asimismo, se ha comunicado que los linfocitos T citotóxicos tipo 1 confieren un efecto protector y promueven un mayor aclaramiento de *Pneumocystis*, mediado por macrófagos, mientras que las células T citotóxicas de tipo 2 promueven un mayor daño a nivel pulmonar (McAllister et. al., 2004).

La interacción de *Pneumocystis* con el macrófago alveolar ha sido foco de intensa investigación (Nelson et. al., 2011; Steele et. al., 2003). Los macrófagos son las principales células fagocíticas del tracto respiratorio inferior, y cuando son estimuladas por citoquinas inflamatorias tales como IFN- $\gamma$ , son el tipo de célula principal responsable de la captación y la eliminación de patógenos respiratorios.

Se ha descrito que el macrófago promueve la muerte directa de los trofozoítos y quistes de *Pneumocystis* y, además, desempeña un papel central en la dirección de las respuestas inmunes inflamatorias y adaptación del huésped a este microorganismo (Steele et. al., 2003).

La interacción entre *Pneumocystis* y el macrófago en la PcP induce una variedad de mediadores inflamatorios que influyen en la erradicación de este organismo por el huésped (Benfield et. al., 1997; Kolls et. al., 1993). Esta interacción de *Pneumocystis* con el macrófago, es importante porque hay una fuerte evidencia de que el deterioro pulmonar y mortalidad están más estrechamente asociados con la inflamación pulmonar que con la carga del organismo (Limper et. al., 1989; Wright et. al., 2005).

Así, se han descrito los efectos complejos de la interacción de *Pneumocystis* con el macrófago en modelos animales y cultivos *in vitro* (Cheng et. al., 2010; Ezekowitz et. al., 1991) a través del análisis de eventos intermedios tales como regulación de citoquinas y quimioquinas. Las alteraciones en el entorno de pulmón

asociadas con cambios en el estado inmune (inmunocompetente frente inmunosuprimidos) y la posible presencia de coinfecciones (por ejemplo, VIH) dificultan, no obstante, la interpretación de los hallazgos obtenidos.

El estudio del efecto de la PcP en la expresión génica de los macrófagos y del tejido pulmonar permite abordar la complejidad de la interacción huésped-patógeno (Cheng et. al., 2010; Qin et. al., 2010). En este sentido, con el fin de evaluar la influencia de *Pneumocystis* en el pulmón en asociación con la infección por SIV, Qin y colaboradores estudiaron cambios en la expresión de citoquinas y quimioquinas en el tejido pulmonar en macacos infectados con SIV con y sin PcP. Se encontró que los genes inmunes más estimulados fueron aquellos que codificaban la producción de IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ -inducible, CXCR3, los ligandos de CCR5, y sus receptores de quimioquinas afines. Estos cambios fueron mayores en monos con SIV y *Pneumocystis*, permitiendo sugerir las vías inflamatorias específicas en los modelos de infección por VIH y PcP. La identificación de esta vías permitiría seleccionar agentes terapéuticos específicos para control o interrupción de las respuestas inflamatorias potencialmente perjudiciales en el pulmón (Qin et. al., 2010).

En cuanto a la respuesta inflamatoria sistémica, es ampliamente conocido que los pacientes con EPOC tienen unos niveles elevados de citoquinas circulantes y reactantes de fase aguda, incluyendo TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8, hallazgos que han sido relacionados con la pérdida de peso y el deterioro muscular de estos pacientes (Wagner et. al., 2008; Verhage et. al., 2011). Además se ha sugerido que sujetos con marcadores de respuesta inflamatoria sistémica elevados experimentan un acelerado deterioro de la función pulmonar y tienen mayor riesgo de hospitalización por la enfermedad en el futuro. (Gan et. al., 2004). Por tanto, parece clara la asociación entre progresión de la EPOC e inflamación sistémica.

Sin embargo, hasta ahora la respuesta inflamatoria sistémica asociada a la colonización por *Pneumocystis* en pacientes con EPOC es prácticamente desconocida. En un estudio previo realizado en nuestro área (Varela et. al., 2003) se detectó que aquellos pacientes con EPOC colonizados por *Pneumocystis* tenían un mayor recuento de linfocitos T CD4+ en sangre periférica que los controles no colonizados. Aunque el significado clínico de este hallazgo es incierto, se postuló su posible relación con la progresión de la enfermedad.

Los resultados de un estudio piloto previo realizado por nuestro grupo mostraron por primera vez un aumento de la interleucina-6 (IL-6), IL-8 y TNF- $\alpha$  en sangre periférica de los pacientes con EPOC colonizados, lo que sugiere que la presencia de *Pneumocystis* no es un epifenómeno, sino que produce una respuesta inflamatoria en el hospedador. (Calderón et. al., 2007).

Los resultados que se muestran en el presente trabajo, con una población más amplia, confirman que los pacientes con EPOC colonizados por *P. jirovecii* presentan un aumento significativo de citoquinas proinflamatorias IL 8, IL6 y TNF- $\alpha$  a nivel sistémico. Además, en nuestro estudio se evalúa el papel que puede jugar el macrófago en la inducción de la cascada inflamatoria mediante la determinación de la proteína MCP-1 en el suero de estos pacientes. Nuestros datos muestran un aumento significativo de sus niveles que sugiere que el macrófago podría ser el desencadenante de la respuesta inflamatoria del hospedador.

La similitud entre la respuesta inflamatoria pulmonar que ocurre frente a la colonización por *Pneumocystis* y la observada en la EPOC es concordante con la hipótesis de que el patógeno podría estar implicado en el daño pulmonar que aparece durante la progresión de la enfermedad. Por otra parte, sería plausible también que la activación de células inflamatorias en el parénquima pulmonar por la presencia de *Pneumocystis* podría representar una fuente de mediadores inflamatorios que alcanzando la circulación sistémica fueran capaces de inducir una exacerbación de la respuesta inflamatoria sistémica.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la colonización por *Pneumocystis*, a través de la respuesta inflamatoria que provoca, podría jugar un papel causal o potenciador de la progresión de enfermedades pulmonares en las que la colonización por dicho patógeno es común. Así la presencia del patógeno en el pulmón puede tener como consecuencia daño tisular y el consiguiente empeoramiento de la función pulmonar. Sin embargo, se necesitan nuevos estudios que delimiten el verdadero papel de la colonización en esta patología y que determinen el mecanismo exacto de su efecto en el pulmón. Adicionalmente, sería necesario evaluar si el tratamiento anti-*Pneumocystis* puede atenuar el proceso inflamatorio en estos pacientes colonizados lo que permitiría tratar un posible factor de progresión de esta devastadora enfermedad.



## **CONCLUSIONES**



1. Los resultados de este estudio confirman la existencia de una elevada prevalencia de colonización por *P. jirovecii* (55%) en pacientes con EPOC y, por primera vez, muestran en nuestra área una elevada tasa de exposición al patógeno (81%) en este grupo de pacientes.
2. La prevalencia de colonización por *Pneumocystis* es elevada en todos los estadios de la EPOC, con un incremento continuo, aunque no significativo, en la tasa de colonización conforme empeora la gravedad de la obstrucción espirométrica.
3. El patrón de genotipos observado en el gen mt LSU rRNA muestra un predominio del genotipo 3, similar al comunicado previamente en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas de nuestro entorno. La presencia de mutaciones en el gen de la DHPS, asociadas a resistencia a cotrimoxazol, alcanzó un 20% de los casos. Este hecho, observado en personas no tratadas con sulfamidas, refuerza la idea de la posible transmisión de *P. jirovecii* con mutaciones en el gen de la DHPS entre personas y podría tener un importante impacto epidemiológico por su potencial transmisión a personas inmunodeprimidas en riesgo de desarrollar neumonía por el patógeno.
4. En el presente trabajo se evalúa la respuesta inflamatoria local y sistémica en pacientes con EPOC colonizados. Nuestros resultados demuestran por primera vez que la colonización en estos pacientes se asocia a un incremento local de los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-8 y MCP-1) e induce una respuesta inflamatoria sistémica mediada por un aumento significativo en los niveles circulantes de IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-6 y MCP-1.
5. Globalmente los resultados del presente estudio sugieren que el estado de colonización por *Pneumocystis* en estos pacientes, puede actuar como cofactor que incremente y mantenga la respuesta inflamatoria del huésped contribuyendo a acelerar la progresión de la EPOC.

## **BIBLIOGRAFÍA**

AGN Agustí. Susceptibilidad a la EPOC. Arch Bronconeumol 2000;36(Suppl 3):28-31

Aliouat EM, Martinez A, Jimenez E, Dei-Cas E, Mullet C, Delcourt P, et. al. Development of pneumocystosis animal models: corticosteroid-treated Wistar rat; SCID mouse and nude rat. J Eukaryot Microbiol.1997 Nov-Dec;44(6):41S-42S.

Antó JM, Vermeire P, Vestbo J, Sunyer J. Epidemiology o chronic osbstructive pulmonary disease. Eur Respir J 2001; 17: 982-994.

Arcenas RC, Uhl JR, Buckwalter SP, Limper AH, Crino D, Roberts GD, Wengenack NL. A real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pneumocystis* from bronchoalveolar lavage fluid. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006 Mar;54(3):169-75.

Armbruster C, Hassi A, Kriwanek S. *Pneumocystis carinii* colonization in the absence of immunosuppression.Scand J Infect Dis 1997;29: 591-593.

Atzori C, Mainini A, Agostoni F, Angeli E, Bartlett M, Bruno A, et al. Detection of rat *Pneumocystis carinii* proteinases and elastase and anti *Pneumocystis* activity of proteinase inhibitors in vitro. Parasite 1999;6:9–16

Barberà JA, Peces-Barba G, Agustí AG, Izquierdo JL, Monsó E, Montemayor T, et al. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). [Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of chronic obstructive pulmonary disease]. Arch Bronconeumol. 2001 Jun;37(6):297-316.

Barczyk A, Sozańska E, Trzaska M, Pierzchala W. Decreased levels of myeloperoxidase in induced sputum of patients with COPD after treatment with oral glucocorticoids. Chest. 2004 Aug;126(2):389-93.

Barnes PJ. Genetics and pulmonary medicine.9. Molecular genetics of chronic obstructive pulmonary disease.Thorax 1999;54(3):245-252.

- Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; 343:269–80.
- Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*. 2003;22:672-688.
- Barnes PJ: Chronic Obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; 343(4): 269-280. Beard CB, Fox MR, Lawrence GG, et. al. Genetic differences in *Pneumocystis* isolates recovered from immunocompetent infants and from adults with AIDS: epidemiological implications. *J Infect Dis* 2005; 192:1815– 8.
- Barnes PJ. Molecular genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999; 54:245-252. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:183-192.
- Barter C, Campebell A. Relationship of constitutional factors and cigarette smoking to decrease in VEF1. *Am Rev Respir Dis* 1976; 112:304-314.
- Beard CB, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura IN, et. al. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg Infect Dis* 2005; 36:1340-2.
- Beck JM, Warnock ML, Curtis JL, Sniezek MJ, Arraj-Peffer SM, Kaltreider HB, et. al. Inflammatory responses to *Pneumocystis carinii* in mice selectively depleted of helper T lymphocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1991 Aug;5(2):186-97.
- Beck JM, Newbury RL, Palmer BE, Warnock ML, Byrd PK, Kaltreider HB. Role of CD8+ lymphocytes in host defense against *Pneumocystis carinii* in mice. *J Lab Clin Med*. 1996 Nov;128(5):477-87.
- Benfield TL, Lundgren B, Levine SJ, Kronborg G, Shelhamer JH, Lundgren JD. The major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii* induces release and gene expression of interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha in monocytes. *Infect Immun*. 1997 Nov;65(11):4790-4.
- Benfield TL, Lundgren B, Shelhamer JH, Lundgren JD. *Pneumocystis carinii* major surface glycoprotein induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 release from a human alveolar epithelial cell line. *Eur J Clin Invest* 1999; 29:717–22.

Blaxhult A, Kirk O, Pedersen C, Dietrich M, Barton SE, Gatell JM, et. al. Regional differences in presentation of AIDS in Europe. *Epidemiol Infect* 2000 Aug;125(1):143-151

Britton JR, Pavord ID, Richards KA, Knox AJ, Wisniewski AF, Lewis SA, et. al. Dietary antioxidant vitamin intake and lung function in the general population. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1383-1387.

Board KF, Patil S, Lebedeva I, Capuano S 3rd, Trichel AM, Murphey-Corb M, et. al. Experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *J Infect Dis* 2003;187:576-588

Conferencia de consenso sobre EPOC. *Arch Bronconeumol* 2003;39 ( suppl 3):1-47.

Calderón EJ, Regordan C, Medrano FJ, Ollero M, Varela JM. *Pneumocystis carinii* infection in patients with chronic bronchial disease. *Lancet* 1996; 347: 977.

Calderón EJ, Varela JM, Medrano FJ, Nieto V, Respaldiza-Salas N, de la Horra-Padilla C, et al. Historical perspective on *Pneumocystis carinii* infection *Protist* 2002; 153 (4):303-310.

Calderón E, Dei-Cas E, Lundgren B, Nevez G, Prevost MC, Roux P, et. al. Prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization among European patients with Chronic Pulmonary Diseases. En: Program and abstracts of the IX International Workshops on Opportunistic Protists (IWOP-9). Lisboa, 20-24 Junio, 2006; 63-64 [resumen PO36].

Calderón EJ, de la Horra C, Medrano FJ, López-Suárez A, Montes-Cano MA, Respaldiza N, et. al. *Pneumocystis jirovecii* isolates with dihydropteroate synthase mutations in patients with chronic bronchitis *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 7: 545-549.

Calderón EJ, Rivero L, Respaldiza N, Morilla R, Montes-Cano MA, Friaiza V, et al Systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Infect Dis*. 2007 Jul 15;45(2):e17-9.

Calderon EJ. Epidemiology of *Pneumocystis* infection in human. *J Myc Med*. 2009; 19: 270-275.

Calderon Sandubete E, de Armas Rodríguez Y, Capó de Paz V. *Pneumocystis jirovecii*: cien años de historia. Rev Cubana Med Trop. 2011; 63 (2): 97-116.

Cano S, Capote F, Pereira A, Calderón E, Castillo J. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without predisposing illnesses. Acute episode and follow-up of five cases. Chest 1993; 104: 376-81

Cardenal R, MedranoFJ, Varela JM, Ordoñez A, Regordán C, Rincón M, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia in heart transplant recipients. Eur J Cardio Thorac Surg 2001; 20:799-802.

Chabé M, Dei-Cas E, Creusy C, Fleurisse L, Respaldiza N, Camus D, et. al. Immunocompetent host as a reservoir of *Pneumocystis* organism: histological and RT-PCR data demonstrate active replication. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004; 23: 89-97..

Cheng BH, Liu Y, Xuei X, Liao CP, Lu D, Lasbury ME, et. al. Microarray studies on effects of *Pneumocystis carinii* infection on global gene expression in alveolar macrophages. BMC Microbiol. 2010 Apr 8;10:103.

Christensen PJ, Preston AM, Ling T, Du M, Fields WB, Curtis JL, et al. *Pneumocystis murina* infection and cigarette smoke exposure interact to cause increased organism burden, development of airspace enlargement, and pulmonary inflammation in mice. Infect Immun. 2008 Aug;76(8):3481-90.

Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J Suppl. 2001 Dec;34:50s-59s

Churg A, Wang RD, Dai J Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Dai J, et. al. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke induced inflammation via tumor necrosis factor alpha release. Am J Respir Crit Care Med 2003; 167(8):1083-1089.

Coleman L, Doder P, Golden J, Luce J, Golden , Gold W, et al. Correlation between serial pulmonary function test and fiberoptic bronchoscopy in patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia and the acquired immune deficiency syndrome. Am Rev Respir Dis 1984; 129:491-93.

Conferencia de consenso sobre EPOC 2003. Arch Bronconeumol 2003; (Suppl3):1-47)

Cosío MG, Majo J, Cosío MG. Inflammation of the airways and lung parenchima in COPD: role of cells. Chest 2002; 121 (5 suppl): 160s-5s.

Croix DA, Board K, Capuano S 3rd, Murphey-Corb M, Haidaris CG, Flynn JL, et. al. Alterations in T lymphocyte profiles of bronchoalveolar lavage fluid from SIV- and *Pneumocystis carinii*-coinfected rhesus macaques. AIDS Res Hum Retroviruses. 2002 Mar 20;18(5):391-401.

Crothers K, Butt AA, Gibert CL, Rodriguez-Barradas MC, Crystal S, Justice AC et. al. Increased COPD among HIV-positive compared to HIV-negative veterans. Chest 2006 130:1326-1333.

Culpitt SV, Maziak W, Loukidis S, Nightingale JA, Matthews JL, Barnes PJ. Effects of high dose of inhaled steroid on cells, cytokines and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 1999; 160(5): 1635-1639.

Cushion MT, Smulian AG. *Pneumocystis* 2006: summary of the research presented at the Ninth International Workshop on Opportunistic Protists. J. Eukaryot. Microbiol. 2006 Nov;53(1): 80-4

Daly K, Koch J, Respaldiza N, de la Horra C, Montes-Cano MA, Medrano FJ, Varela JM, Calderon EJ, Walzer PD. Geographical variation in serological responses to recombinant *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein antigens. Clin Microbiol Infect. 2009 Oct;15(10):937-42.

Davis RM, Novotny TE. E The epidemiology of cigarette smoking and its impact on chronic obstructive pulmonary disease. Am Rev Respir Dis 1989; 140:s82-s84.

Dei-Cas E, Fleurisse L, Aliouat EM, Bahun-Le Capon J, Cailliez JC, Creusy C. Morphological and ultrastructural methods for *Pneumocystis*. FEMS Immunol. Med Microbiol 1998 , Vol. 22, pp. 185-189, ISSN 0928-8244

Dei Cas E, Mazars E, Aliouat EM, Nevez G, Caillez JC, Camus D. The host-specificity of *Pneumocystis carinii*. J Mycol Med 1998b;8:1-6.

Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I, Aarts LP, Wielders PL, van Herwaarden CL, et al. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 1996 Sep;154(3 Pt 1):813-6.

de la Horra C, Varela JM, Fernández-Alonso J, Medrano FJ, Respaldiza N, Montes-Cano MA, et. al. Association between human - *Pneumocystis* infection and small-cell lung carcinoma. Eur J Clin Invest 2004; 34:229–235.

De la Horra C, Varela JM, Friaiza V, Respaldiza N, Muñoz-Lobato F, Montes-Cano MA, et. al. Comparison of single and touchdown PCR protocols for detecting *Pneumocystis jirovecii* DNA in paraffin-embedded lung tissue samples. J. Eukaryot. Microbiol 2006. Vol. 53, (Suppl 1), pp. 98-99, ISSN 1066-5234

Demanche C, Wanert F, Herrenschmidt N, Moussu C, Durand-Joly I, Dei-Cas E, et. al. Influence of climatic factors on *Pneumocystis* carriage within a socially organized group of immunocompetent macaques (*Macaca fascicularis*). J Eukaryot Microbiol 2003;50 Suppl:611–3.

Dennis RJ, Maldonado D, Norman S, Baena E, Castano H, Martinez G et. al. Wood smoke exposure and risk for obstructive airways disease among women. Chest 1996; 109(3 Suppl): 55s-6s.

Diaz PT, King MA, Pacht ER, Wewers MD, Gadek JE, Nagaraja HN, et. al. Increased susceptibility to pulmonary emphysema among HIV-seropositive smokers. Ann Intern Med 2000;132:369–372.

Di Francia M, Barbier D, Orehek J. Tumor necrosis factor alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:1453-1455.

Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, et. al. Increased expression of nuclear factor kappa in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J* 2002; 20 556-563.

Durand- Joly I, Aliouat EM, Recourt C, Guyot K, Francois N, Wauquier M, et al. *Pneumocystis carinii f.s.p. hominis* is not infectious to SCID mice. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1862-1865

Durand-Joly I, Chabé M, Soula F, Delhaes L, Camus D, Dei-Cas E. Molecular diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005; 45(3):405-10

Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature.* 1988 Aug 11;334(6182):519-22.

Esteves F, Medrano FJ, de Armas Y, Wissmann G, Calderón EJ, Matos O. *Pneumocystis* and Pneumocystosis: first meeting of experts from Latin-American and Portuguese-speaking countries - a mini-review. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014 May;12(5):545-8.

Ezekowitz RA, Williams DJ, Koziel H, Armstrong MY, Warner A, Richards FF, et al. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature.* 1991 May 9;351(6322):155-8.

Filkenstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1666-1672.

Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, et. al. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Jul; 156(1):240-7.

Fitzpatrick ME, Tedrow JR, Hillenbrand ME, Lucht L, Richards T, Norris KA, et al. *Pneumocystis jirovecii* colonization is associated with enhanced Th1 inflammatory gene expression in lungs of humans with chronic obstructive pulmonary disease. *Microbiol Immunol*. 2014 Mar; 58(3):202-11.

Fleischman JK, Greenberg H, Web A. Small airways dysfunction in patients with AIDS and *Pneumocystis carinii* pneumonia. *AIDS Patient Care STDS* 1996;10:16–20.

Flori P, Bellete B, Durand F, Raberin H, Cazorla C, Hafid J, et. al. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from broncho-alveolar lavage specimens. *J Med Microbiol*. 2004; 53 (Pt 7): 603-7

Frenkel JK. *Pneumocystis jirovecii* n.s.p. from man: morphology, physiology and immunology in relation to pathology. *Natl Cancer Inst Monogr* 1976;43:13-30.

Frenkel JK *Pneumocystis* pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease: a critical overview. *J Euk Microbiol* 1999;46 (Suppl):89-92.

Friaza V, Morilla R, Respaldiza N, de la Horra C, Calderon EJ. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations among colonized individuals and *Pneumocystis* pneumonia patients from Spain. *Postgrad Med*. 2010; 122(6): 24-8.

Gan WQ, Man SFP, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: asystematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004; 59:574–80.

Gigliotti F. Host species-specific antigenic variation of amannosylated surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 1992; 165: 329–336.

Gigliotti F. *Pneumocystis carinii* nomenclature: response to Cushion and Stringer. *Clin Infect Dis*. 2006 Apr 15;42(8):1208-9

Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of Chronic Obstructive Lung Disease. Executive Summary Updated 2004. [www.goldcopd.com](http://www.goldcopd.com).

Gottlieb MS, Schorff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonitis and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med 1981; 305: 1424-1431.

Guía española de la EPOC (GesEPOC). Actualización 2014 Arch Bronconeumol. 2014;50(Supl.1):1-16 - Vol. 50 Núm.Supl.1

Gutiérrez S, Respaldiza N, Campano E, Martínez-Risquez MT, Calderón EJ et al. *Pneumocystis jirovecii* colonization in chronic pulmonary disease. Parasite. 2011 May;18(2):121-6

Hauser PM, Nahimana A, Taffe P, Weber R, Francioli P, Bille J, et al. Interhuman transmission as a potential key parameter for geographical variation in the prevalence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase mutations. Clin Infect Dis. 2010 Aug 15;51(4):e28-33.

Hautamaki RD, Senior RM, Saphiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke induced emphysema in mice. Science 1997; 277:2002-2004.

Helweg-Larsen J, Jensen JS, Lundgren B. Non-invasive diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by PCR on oral washes. Lancet. 1997; 350 (9088): 1363.

Helweg-Larsen J, Benfield TL, Eugen Olsen J, Lundgren B. Effects of mutation in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of AIDS associated *P. carinii* pneumonia. Lancet 1999; 354:1347-51.

Helweg-Larsen J, Jensen JS, Dohn B, Benfield TL, Lundgren B. Detection of *Pneumocystis* DNA in samples from patients suspected of bacterial pneumonia—a case-control study. BMC Infect Dis 2002;2:28.

Hernández-Hernández F, Fréalle E, Caneiro P, Salleron J, Durand-Joly I, Accoceberry I, et al. Prospective multicenter study of *Pneumocystis jirovecii* colonization among cystic fibrosis patients in France. J Clin Microbiol. 2012 Dec;50(12):4107-10.

Hill AT, Bayley D, Stockeley RA. The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(3): 893-898.

Hu G, Zhou Y, Tian J, Yao W, Li J, Li B, et al. Risk of COPD from exposure to biomass smoke: a metaanalysis. *Chest*. 2010 Jul;138(1):20-31.

Huang SL, SU CH, Chang SC. Tumor necrosis factor –alpha gene polymorphism in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(5):1436-1439.

Huang L, Beard CB, Creasman J, Levy D, Duchin JS, Lee S, et. al. Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. *J Infect Dis*. 2000; 182: 1192-8.

Huang L, Crothers K, Morris A, Groner G, Fox M, Turner JR, et. al. *Pneumocystis* colonization in HIV-infected patients. *J Eukaryot Microbiol* 2003; 50 Suppl:616–7.

Huang L, Crothers K, Atzori C, Benfield T, Miller R, Rabodonirina M, et. al., Dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis* and sulfa resistance. *Emerg Infect Dis*. 2004 Oct;10(10):1721-8

Hughes WT. (2004). *Pneumocystis* Pneumonitis in Non-HIV-Infected Patients: Update. In: *Pneumocystis carinii* Pneumonia (3rd edition). Walzer PD, Cushion MT (eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 407-434, ISBN 0-8247-5451-4

Huggett JF, Taylor MS, Kocjan G, Evans HE, Morris-Jones S, Gant V, et. al. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients. *Thorax* 2008, Vol. 63, pp. 154-159, ISSN 0028-4793

Hogg J. Latent adenoviral infections in the pathogenesis of COPD. *Eur Respir J* 1997;7: 216-220

Icenhour CR, Rebholz SL, Collins MS, Cushion MT: Widespread occurrence of *Pneumocystis carinii* commercial rat colonies detected using targeted PCR and oral swabs. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3437-3441.

Jacobs JL, Libby DM, Winters RA, Gelmont DM, Fried ED, Hartman BJ, et. al. A cluster of *Pneumocystis carinii* pneumonia in adults without predisposing illness. N Engl J Med 1991;324:246-250.

Jaffe HW, Bregman DJ, Selik RM. Acquired immune deficiency syndrome in the United States: the first 1,000 cases. J Infect Dis. 1983 Aug;148(2):339-45.

Jaffe H, Choi K, Thomas PA, Haverkos HW, Auerbach DM, Guinan ME, et. al. National case control study of Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis* pneumonia in homosexual men: Part 1. Epidemiologic results. Ann Intern Med 1983;99:145-151.

Kaplan JE, Hanson D, Dworkin MS, Frederick T, Bertolli J, Lindegren ML, et. al. Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. Clin Infect Dis. 2000 Apr;30 Suppl 1:S5-14.

Kasolo F, Lishimpi K, Chintu C, Mwaba P, Mudenda V, Maswahu D, et. al. Identification of *Pneumocystis carinii* DNA by polymerase chain reaction in necropsy lung samples from children dying of respiratory tract illnesses. J Pediatr 2002; 140:367-9.

Kazanjan P, Locke AB, Hessler PA, Lane BR, Bartlett MS, Smith JW, et. al. *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfona prophylaxis failures in AIDS patients. AIDS 1998;12:837-8.

Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. Am J Respir Crit Care Med. 1996 Feb;153(2):530-4.

Kling HM, Shipley TW, Patil SP, Kristoff J, Bryan M, Montelaro RC, et. al. Relationship of *Pneumocystis jiroveci* humoral immunity to prevention of colonization and chronic obstructive pulmonary disease in a primate model of HIV infection. Infect Immun. 2010 Oct;78 (10):4320-30.

Kolls JK, Habetz S, Shean MK, Vazquez C, Brown JA, Lei D, et. al. IFN-gamma and CD8+ T cells restore host defenses against *Pneumocystis carinii* in mice depleted of CD4+ T cells. J Immunol. 1999 Mar 1;162(5):2890-4.

Kolls JK, Beck JM, Nelson S, Summer WR, Shellito J. 1993. Alveolar macrophage release of tumor necrosis factor during murine *Pneumocystis carinii* pneumonia. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 8:370–376.

Krajicek B, Thomas CF, Limper AH. *Pneumocystis* pneumonia: current concepts in pathogenesis, diagnosis and treatment. Clin Chest Med 2009;30:265—78.

Lane BR, Ast JC, Hossler PA, Mindell DP, Bartlett MS, Smith JW, et al. Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. J Infect Dis. 1997 Feb;175(2):482-5

Larsen HH, von Linstow ML, Lundgren B, Høgh B, Westh H, Lundgren JD. Primary *Pneumocystis* infection in infants hospitalized with acute respiratory tract infection. Emerg Infect Dis 2007; 13:66–72.

Leigh TR, Kangro HO, Gazzard BG, Jeffries DJ, Collins JV. DNA amplification by the polymerase chain reaction to detect subclinical *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-positive and HIV-negative male homosexuals with and without respiratory symptoms. Respir Med 1993; 87:525–9.

Limper AH, Offord KP, Smith TF, Martin WJ II. *Pneumocystis carinii* pneumonia. Differences in lung parasite number and inflammation in patients with and without AIDS. Am. Rev. Respir. Dis. 1989; 140:1204–1209.

Lundgren B, Lundgren JD, Nielsen T, Mathiesen L, Nielsen JO, Kovacs JA. Antibody responses to a major *Pneumocystis carinii* antigen in human immunodeficiency virus-infected patients with and without *P. carinii* pneumonia. J Infect Dis. 1992 Jun;165(6):1151-5.

Lundgren B, Lebech M, Lind K, Nielsen JO, Lundgren JD. Antibody response to a major human *Pneumocystis carinii* surface antigen in patients without evidence of immunosuppression and in patients with suspected atypical pneumonia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1993 Feb;12(2):105-9.

Macnee W, Rahman I. Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: s58-s65.

Mallia P, Message SD, Keadze T, Parker HL, Kon OM, Johnston SL. An experimental model of rhinovirus induced chronic obstructive pulmonary disease exacerbations: a pilot study. *Respir Res* 2006;7:116.

Mansharamani NG, Balachandran D, Vernovsky I, Garland R, Koziel H. 2000. Peripheral blood CD4<sup>+</sup>T-lymphocyte counts during *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised patients without HIV infection. *Chest* 118:712–720.

Martin TR, Raghu G, Maunder RJ, Springmeyer SC. The effects of chronic bronchitis and chronic air flow obstruction on lung cell populations recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132(2): 254-260.

Maskell NA, Waine DJ, Lindley A, Pepperell JC, Wakefield AE, Miller RF, et al. Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jiroveci* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. *Thorax* 2003;58:594–597.

Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onarato I, Stouwe RAV, Cunningham- Rundles S. An outbreak of community acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestations of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med* 1981; 305: 1431-1438.

Matos O, Costa MC, Correia I, Monteiro P, Monteiro M, Soares J, et. al. *Pneumocystis jirovecii* carriage in Portuguese immunocompetent patients: preliminary results. *J Eukaryot Microbiol.* 2003;50 Suppl:647-8

Matos O, Costa MC, Correia I, Monteiro P, Monteiro M, Soares J, et. al. *Pneumocystis jiroveci* in Portuguese immunocompromised patients: association of specific ITS genotypes with treatment failure, bad clinical outcome and childhood. *Infect Genet Evol* 2003; 3:281–5.

Matsukura S, Kokubu F, Noda H, Tokunaga H, Adachi M. Expression of IL-6, IL-8, and RANTES on human bronchial epithelial cells, NCI-H292, induced by influenza virus A. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:1080–1087.

McAllister F, Steele C, Zheng M, Young E, Shellito JE, Marrero L, et. al. T cytotoxic-1 CD8+ T cells are effector cells against *pneumocystis* in mice. J Immunol. 2004 Jan 15;172(2):1132-8. Erratum in: J Immunol. 2005 Sep 1;175(5):3447.

Medrano FJ, Respaldiza N, Medrano A, Varela JM, Montes-Cano M, de la Horra C, et al. Seroprevalence of *Pneumocystis* human infection in southern Spain. J Eukaryot Microbiol. 2003;50 Suppl:649-50.

Medrano FJ, Montes-Cano MA, Conde M, De la Horra C, Respaldiza N, Gasch A, et al. *Pneumocystis jirovecii* in general population. Emerg Infect Dis 2005; 11: 245-250.

Mekinian A, Durand-Joly I, Hatron PY, Moranne O, Denis G, Dei-Cas E, et al; *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with systemic autoimmune diseases: prevalence, risk factors of colonization and outcome. Rheumatology 2011 50:569 –577

Michel P, Habbib M, Burrows B. Chronic airways obstruction: The importance of certain risk factors for its development. Current Pulmonology 1990; 11:247-271.

Molet S, Belleguic C, Lena H, Germain N, Bertrand CP, Shapiro SD, et al . Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. Inflamm Res. 2005 Jan;54(1):31-6.

Monsó E, Rosell A, Bonet G, Manterola J, Cardona PJ, Ruiz J, et. al. Risk factors for lower airway bacterial colonization in chronic bronchitis. Eur Respir J 1999; 13:343-348.

Montes-Cano MA, de la Horra C, Martin-Juan J, Varela JM, Torronteras R, Respaldiza N, et al. *Pneumocystis Jirovecii* Genotypes in the Spanish population.. Clin Infect Dis 2004; 39:123-8.

Morgan DJ, Vargas SL, Reyes-Mugica M, Walterspiel JN, Carver W, Gigliotti F. Identification of *Pneumocystis carinii* in the lungs of infants dying of sudden infant death syndrome. Pediatr Infect Dis J. 2001 Mar;20(3):306-9.

Morris AM, Huang L, Bacchetti P, Turner J, Hopewell PC, Wallace JM, et al. Permanent declines in pulmonary function following pneumonia in human immunodeficiency virus-infected persons. The Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 612-616.

Morris A, Kingsley LA, Groner G, Lebedeva IP, Beard CB, Norris KA. Prevalence and clinical predictors of *Pneumocystis* colonization among HIV-infected men. *AIDS* 2004 a;18:793– 8.

Morris A, Sciruba FC, Lebedeva IP, Githaiga A, Elliott WM, Hogg JC, et al. Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis* colonization. *Am J Respir Crit Care Med* 2004 b;170:408–413.

Morris A, Netravali M, Kling HM, Shipley T, Ross T, Sciruba FC, Norris KA. Relationship of *Pneumocystis* antibody response to severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Infect Dis*. 2008 Oct 1;47(7):e64-8.

Morris A, Sciruba FC, Norris KA. *Pneumocystis*: A Novel Pathogen in Chronic Obstructive Pulmonary Disease? COPD. 2008 February ; 5(1): 43–51.

Morris A, Alexander T, Radhi S, Lucht L, Sciruba FC, Kolls JK, et al. Airway obstruction is increased in *pneumocystis*-colonized human immunodeficiency virus-infected outpatients. *J Clin Microbiol*. 2009 Nov;47(11):3773-6.

Morris A and Norris KA Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and Its Role in Disease *Clin. Microbiol. Rev.* 2012, 25(2):297

Murphy Tf, Seit S. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:1067-1083.

Murphy TF, Brauer AL, Schiffmacher AT, Sethi S. Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:266-72.

Nelson MP, Christmann BS, Werner JL, Metz AE, Trevor JL, Lowell CA, et al. IL-33 and M2a alveolar macrophages promote lung defense against the atypical fungal pathogen *Pneumocystis murina*. *J Immunol*. 2011 Feb 15;186(4):2372-81

Nevez G, Jounieaux V, Linas MD, Guyot K, Leophonte P, Massip P, et. al. High frequency of *Pneumocystis carinii* sp.f. *hominis* colonization in HIV-negative patients. J Eukaryot Microbiol 1997; 44:36S.

Nevez G, Raccurt C, Vincent P, Jounieaux V, Dei-Cas E. Pulmonary colonization with *Pneumocystis carinii* in human immunodeficiency virus-negative patients: assessing risk with blood CD4+ T cell counts. Clin Infect Dis. 1999 Nov;29(5):1331-2.

Nevez G, Totet A, Pautard JC, Raccurt C. *Pneumocystis carinii* detection using nested-PCR in nasopharyngeal aspirates of immunocompetent infants with bronchiolitis. Eukaryot Microbiol 2001; Suppl:122S–3S.

Nevez G, Magois E, Duwat H, Gouilleux V, Jounieaux V, Totet A. Apparent absence of *Pneumocystis jirovecii* in healthy subjects. Clin Infect Dis 2006; 42:e99 –101.

Ng VL, Yajko DM, Hadley WK. Extrapulmonary pneumocystosis. Clin Microbiol Rev 1997, Vol. 10, pp. 401-418, ISSN 0893-8512

Nkinin SW, Daly KR, Walzer PD, Ndzi ES, Asonganyi T, Respaldiza N, et al. Evidence for high prevalence of *Pneumocystis jirovecii* exposure among Cameroonians. Acta Trop. 2009 Nov;112(2):219-24.

Nyamande K, Lalloo UG, Vawda F. Comparison of plain chest radiography and high-resolution CT in human immunodeficiency virus infected patients with community-acquired pneumonia: a sub-Saharan Africa study. Br J Radiol, 2007; Vol. 80, pp. 302-306, ISSN 0007-1285

Norris KA, Morris A, Patil S, Fernandes E. *Pneumocystis* colonization, airway inflammation, and pulmonary function decline in acquired immunodeficiency syndrome. Immunol Res. 2006;36(1-3):175-87.

O'Donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R. Inflammatory cells in the airways in COPD. Thorax. 2006;61:448-454.

Ognibene FP, Shelhamer JH, Hoffman GS, Kerr GS, Reda D, Fauci AS, et. al. *Pneumocystis carinii* pneumonia: a major complication of immunosuppressive therapy in patients with Wegener's granulomatosis. 1995. Am J Respir Crit Care Med 151:795-799.

Ohnishi K, Takagi M, Konttinen YT. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. Lab Invest 1998;78(9):1077-1087.

Olsson M, Elvin K, Löfdahl S, Linder E. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in sputum and bronchoalveolar lavage samples by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993, Vol. 31, pp. 221-226, ISSN 0095-1137

Orie N. Bronchitis .Assen The Netherlands: Royal Vangorcum 1961,43-49

O'Riordan DM, Standing JE, Kwon KY, Chang D, Crouch EC, Limper AH. Surfactant protein D interacts With *Pneumocystis carinii* and mediates organism adherence to alveolar macrophages. J Clin Invest 1995, 95:2699-2710

Oz HS, Hughes WT. DNA amplification of nasopharyngeal aspirates in rats: a procedure to detect *Pneumocystis carinii*. Microb Pathog. 1999; 27: 119-21.

Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, Caramori G, et al. Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. Am J Respir Crit Care Med 2006;173:1114–1121.

Patel IS, Seemungal TA, Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wedzicha JA. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character and severity of COPD exacerbations. Thorax 2002;57:759-764.

Patel IS, Vlahos I, Wilkinson TM, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wilks M, et. al. Bronchiectasis, exacerbation indices, and inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 2004;170:400-7.

Patil SP, Board KF, Lebedeva IP, Norris KA. Immune responses to *Pneumocystis* colonization and infection in a simian model of AIDS. J Eukaryot Microbiol 2003;50(Suppl):661–662.

Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS; GOLD Scientific Committee.. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. Global initiative for Chronic obstructive pulmonary disease (GOLD). *AM J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1256-1276.

Peters SE, Wakefield AE, Sinclair K, Millard PR, Hopkin JM. A search for *Pneumocystis carinii* in post-mortem lungs by DNA amplification. *J Pathol* 1992; 166:195– 8.

Phair J, Muñoz A, Detels R, Kaslow R, Rinaldo C, Saah A. The risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus type 1. Multicenter AIDS Cohort Study Group. *N Engl J Med*. 1990 Jan 18;322(3):161-5.

Prévost MC, Escamilla R, Aliouat EM, Ceré N, Coudert P, Dei-Cas E. *Pneumocystosis* pathophysiology. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; 28: 123-128.

Probst M, Ries H, Schmidt-Wieland T, Serr A. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in patients with chronic lung diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19:644 –5.

Proyecto IBERPOC: Un estudio epidemiológico de la EPOC en España. *Arch Bronconeumol* 1999;35:159-66.

Qin S, Fallert Junecko BA, Trichel AM, Tarwater PM, Murphey-Corb MA, Kirschner DE, et al. Simian immunodeficiency virus infection alters chemokine networks in lung tissues of cynomolgus macaques: association with *Pneumocystis carinii* infection. *Am J Pathol*. 2010 Sep;177(3):1274-85.

Qu J, Rong Z, He L, Pan J, Chen X. Relationship between the burden of *Pneumocystis carinii*, the inflammatory reaction and lung injury in *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Chin Med J (Engl)* 2000;113:1071–1074

Rabodonirina M, Raffenot D, Cotte L, Boibieux A, Mayençon M, Bayle G, et. al. Rapid detection of *Pneumocystis carinii* bronchoalveolar lavage specimens from human immunodeficiency virus-infected patients: use of a simple DNA extraction procedure and nested PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2748 –51.

Rahman I, Macnee W. Role of oxidants/antioxidants in smoking induced lung diseases. *Free Radic Biol Med* 1996; 21:669-681.

Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic bronchitis pulmonary disease. Oxidative stress study group. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 341-357.

Respaldiza N, Medrano FJ, Medrano AC, Varela JM, de la Horra C, Montes-Cano M, et al. High seroprevalence of *Pneumocystis* infection in Spanish children. *Clin Microbiol Infect.* 2004 Nov;10(11):1029-31.

Respaldiza N, Medrano FJ, Medrano AC, Varela JM, de la Horra C, Montes-Cano M, et. al. High seroprevalence of *Pneumocystis* infection in Spanish children. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:1029 –31

Respaldiza N, Montes-Cano MA, Dapena FJ, de la Horra C, Mateos I, Medrano FJ, et. al. Prevalence of colonisation and genotypic characterisation of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11:1012–5.

Respaldiza N, Montes-Cano MA, Friaza V Muñoz-Lobato F, Medrano FJ, Varela JM, et al. Usefulness of oropharyngeal wash on the identification of *Pneumocystis jirovecii* carrier state. *J Eukaryot Microbiol* 2006; 53 (s1): S100-101.

Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciruba FC, et. al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am j Respir Crit Care Med* 2001;164(3):469-473.

Rohde G, Wiethege A, Borg I, Kauth M, Bauer TT, Gillissen A, et al. Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalisation: a case-control study. *Thorax* 2003;58:37–42.

Robberts FJ, Liebowitz LD, Chalkley LJ. Polymerase chain reaction detection of *Pneumocystis jirovecii*: evaluation of 9 assays. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 58 (4): 385-92.

Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Faccini FM, Corbino L, Mapp CE et. al. CD8+ T lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 822-826.

Schliep TC, Yarrish RL. *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Semin Respir Infect.* 1999 Dec;14(4):333-43. Review.

Schols AM, Buurman WA, Wouters EFM . Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2006; 51: 819-824.

Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S, et al. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1618–1623.

Sethi S. Bacterial infection and the pathogenesis of COPD. *Chest* 2000;117:286S–291S.

Sethi S. Bacteria in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: phenomenon or epiphenomenon? *Proc Am Thorac Soc* 2004;1:109–114.

Sethi S, Murphy TF. Infection in the Pathogenesis and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 2008;359:2355-65.

Sethi S, Mahler DA, Marcus P, Owen CA, Yawn B, Rennard S. Inflammation in COPD: implications for management. *Am J Med.* 2012 Dec;125(12):1162-70.

Shapiro SD, Senior RM. Matrix metalloproteinases. Matrix degradation and more. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20(6):1100-1102.

Shaw RJ, Roussak C, Forster SM, Harris JR, Pinching AJ, Mitchell DM. Lung function abnormalities in patients infected with the human immunodeficiency virus with and without overt pneumonitis. *Thorax* 1988;43:436–440

Shellito JE, Tate C, Ruan S, Kolls J. 2000. Murine CD4<sup>+</sup> T lymphocyte subsets and host defense against *Pneumocystis carinii*. J. Infect. Dis. 181: 2011–2017

Shibley TW, Kling HM, Morris A, Patil S, Kristoff J, Guyach SE, et al. Persistent *Pneumocystis* colonization leads to the development of chronic obstructive pulmonary disease in a nonhuman primate model of AIDS. J Infect Dis. 2010 Jul 15;202(2):302-12.

Silverman EK, Chapman HA, Drazen JM, Weiss ST, Rosner EJ, Campbell EJ et. al. Genetic epidemiology of severe, early onset chronic obstructive pulmonary disease- Risk to relatives for airflow obstruction and chronic bronchitis. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157:1770-1778.

Sinclair K, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin JM. *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. Mol Biochem Parasitol. 1991 Mar;45(1):183-4.

Sing A, Roggenkamp A, Autenrieth IB, Heesemann J. *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR. J Clin Microbiol 1999; 37:3409-10.

Sing A, Geiger AM, Hogardt M, Heesemann J. *Pneumocystis carinii* carriage among cystic fibrosis patients, as detected by nested PCR. J Clin Microbiol. 2001 Jul;39(7):2717-8.

Smith CA, Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. Lancet 1997; 350(9078):630-633.

Smith Dk, Neal JJ, Holmberg SD, Idiopathic CD4 lymphocytopenia Task force. Unexplained opportunistic infections and Idiopathic CD4 lymphocytopenia without HIV infection. N Engl J Med 1993;328:373-379.

Sobradillo V, Miravites M, Gabriel R, Jimenez C, Masa F . Geographical variations in prevalence and underdiagnosis of COPD: Results of the IBERPOC multicentre epidemiological study. Chest 2000;118:981-989

Soler N, Ewig S, Torres A, Filella X, Gonzalez J, Zaubet A. Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999;14:1015-22.

Steele C, Zheng M, Young E, Marrero L, Shellito JE, Kolls JK. Increased host resistance against *Pneumocystis carinii* pneumonia in gammadelta T-cell-deficient mice: protective role of gamma interferon and CD8(+) T cells. *Infect Immun.* 2002 Sep;70(9):5208-15.

Steele C, Marrero L, Swain S, Harmsen AG, Zheng M, Brown GD, et al; Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii f. sp. muris* involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *J Exp Med.* 2003 Dec 1;198(11):1677-88.

Steele C, Shellito JE, Kolls JK. Immunity against the opportunistic fungal pathogen *Pneumocystis*. *Medical Mycology* 2005; 43: 1-19.

Stringer SL, Stringer JR, Blase MA, Walzer PD, Cushion MT. *Pneumocystis carinii*: sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. *Exp Parasitol.* 1989 May;68(4):450-61.

Stringer JR, Cushion MT, Wakefield AE. New nomenclature for the genus *Pneumocystis*. *J Euk Microbiol* 2001 44(Suppl):184-189.

Terminology, definitions and classification of chronic pulmonary emphysema and related conditions. A report of the conclusions of a CIBA GHEST SYMPOSIUM, *thorax* 1958;14:286-299

Thomas C., Ballantines S. P, Kellam P, Bains S, Delves C. J. Molecular study of the enzymes involved in the folate biosynthesis pathway, alternative targets for drugs. *Ars Pharmaceutica* 1997; (38-2-3): 129-35

Thomas, CF., Limper, AH. *Pneumocystis* pneumonia. *N Engl J Med.*, 2004; Vol. 350, pp :2487-2498. ISSN 0028-4793

Totet A, Latouche S, Duwat H, Magois E, Lacube P, Pautard JC, et al. Multilocus genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in patients developing diverse forms of parasitism: implication for a wide human reservoir for the fungus. *J Eukaryot Microbiol* 2003; 50 Suppl:670–1.

Van der Lende R. *Bronchitis III*. Assen The Netherlands: Royal Vangorcum 1970,52-70

Varela JM, Respaldiza N, Sánchez B, de la Horra C, Montes-Cano M, Rincón M, et al. Lymphocyte response in subjects with chronic pulmonary disease colonized by *Pneumocystis jirovecii*. *J Eukaryot Microbiol*. 2003;50 Suppl:672-3.

Varela JM, Regordán C, Medrano FJ, Respaldiza N, de La Horra C, Montes-Cano MA, Calderón EJ. Climatic factors and *Pneumocystis jirovecii* infection in southern Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2004 Aug;10(8):770-2.

Varela JM, Medrano FJ, Dei-Cas E, Calderón EJ. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in AIDS Patients. En: *Microbes, viruses and parasites in AIDS process*. Vladimír Zajac, ed. Viena: InTech, 2011, 113-137 (ISBN. 978-953-307-601-0).

Vargas SL, Ponce CA, Hughes WT, Wakefield AE, Weitz JC, Donoso S, Ulloa AV, et al. Association of primary *Pneumocystis carinii* infection and sudden infant death syndrome. *Clin Infect Dis* 1999; 29:1489–93.

Vargas SL, Hughes WT, Santolaya ME, Ulloa AV, Ponce CA, Cabrera CE, et al. Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clin Infect Dis* 2001; 32:855– 61.

Vargas SL, Ponce Ca, Sanchez CA, Ulloa AV, Bustamante R, Juarez G. Pregnancy and asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii*. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 605-606

Vargas SL, Ponce CA, Luchsinger V, Silva C, Gallo M, López R, et al. Detection of *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* and viruses in presumably immunocompetent infants who died in the hospital or in the community. *J Infect Dis*. 2005 Jan 1; 191(1):122-6.

Vargas SL, Ponce CA, Gálvez P, Ibarra C, Haas EA, Chadwick AE, et. al. *Pneumocystis* is not a direct cause of sudden infant death syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26:81–3.

Varthalitis I, Meunier F. *Pneumocystis carinii* pneumonia in cancer patients. *Cancer Treat Rev.* 1993 Oct;19(4):387-413.

Verhage TL, Heijdra Y, Molema J, Vercoulen J, Dekhuijzen R. Association of muscle depletion with health status. Another gender difference in COPD? *Clin Nutr.* 2011;30:332-8.

Vidal S, de la Horra C, Martín J, Montes-Cano MA, Rodríguez E, Respaldiza N, et. al. *Pneumocystis jirovecii* colonisation in patients with interstitial lung disease. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:231–5.

Visconti E, Marinaci S, Zolfo M, Mencarini P, Tamburrini E, Pagliari G, et. al. Very low frequency of *Pneumocystis carinii* DNA detection by PCR in specimens from patients with lung damage. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1307–8.

Willemse BW, Postma DS, Timens W, ten Hacken NH. The impact of smoking cessation on respiratory symptoms, lung function, airway hyperresponsiveness and inflammation. *Eur Respir J.* 2004;23:464-476

Wagner PD. Possible mechanism underlying the development of cachexia in COPD. *Eur Respir J.* 2008;31:492-501.

Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, et. al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet* 1990; 336:451–3.

Wakefield AE, Stewart TJ, Moxon ER, Marsh K, Hopkin JM. Infection with *Pneumocystis carinii* is prevalent in healthy Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84:800–2.

Walzer PD, Kim CK, Linke MJ, Pogue CL, Huerkamp MJ, Chrisp CE, et. al. . Outbreaks of *Pneumocystis carinii* pneumonia in colonies of immunodeficient mice. *Infect Immun.* 1989;57:62-70.

Walzer PD. *Pneumocystis carinii*: recent advances in basic biology and their clinical application. AIDS 1993; 7: 1293-1305.

Walzer PD. Immunological features of *Pneumocystis carinii* infection in humans. Clin Diag Lab Immunol.1999;6:149-155.

Wright TW, Johnston CJ, Harmsen AG, Finkelstein JN. Analysis of cytokine mRNA profiles in the lungs of *Pneumocystis carinii*-infected mice. Am J Respir Cell Mol Biol 1997;17:491–500.

Wright TW, Gigliotti F, Finkelstein JN, McBride JT, An CL, Harmsen AG. Immunemediated inflammation directly impairs pulmonary function, contributing to the pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. J Clin Invest 1999;104:1307-17.

Wright TW, Johnston CJ, Harmsen AG, Finkelstein JN. Chemokine gene expression during *Pneumocystis carinii*-driven pulmonary inflammation. Infect Immun 1999;67: 3452-60.

Wright TW, Gigliotti F, Harmsen A. 2005. Mechanisms of lung injury during *Pneumocystis* pneumonia, p. 327–348. In Walzer PD, Cushion MT (ed), *Pneumocystis* pneumonia, 3rd ed. Marcel Dekker, New York, NY.

Wouters EFM. Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc 2005; 2:26–33.

## **GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

<b>ACCP</b>	del inglés American College of Chest Physicians
<b>ADN,</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ARN,</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ARNr</b>	Acido Ribonucleico ribosomico
<b>ATS</b>	del inglés American Thoracic Society
<b>LBA</b>	Lavado Broncoalveolar
<b>CD4+,</b>	Conjunto de linfocitos con diferenciación 4
<b>CD8+,</b>	Conjunto de linfocitos con diferenciación 8
<b>dATP,</b>	Deosiadénítrifosfato
<b>dCTP,</b>	Deoxicitosíntrifosfato
<b>ddATP,</b>	Dideosiadénítrifosfato
<b>ddCTP,</b>	Dideoxicitosíntrifosfato
<b>ddGTP,</b>	Dideoxiguanosíntrifosfato
<b>ddTTP,</b>	Dideoximidíntrifosfato
<b>dGTP,</b>	Deoxiguanosíntrifosfato
<b>dNTP,</b>	Deoxinucleótidostrifosfato
<b>DFA,</b>	del inglés Direct Immunofluorescence Assay, Ensayo de Inmunofluorescencia Directa
<b>DHPS,</b>	Dihidropteroato sintasa
<b>DLCO</b>	del inglés <b>diffusing capacity</b> or <b>transfer factor of the lung</b> for <b>carbon monoxide</b> Capacidad de difusión del monóxido de carbono
<b>dTTP,</b>	Deoxitimidina trifosfato
<b>EDTA,</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ELISA,</b>	del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
<b>EPOC,</b>	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
<b>GM-CSF,</b>	del inglés Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor, Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos
<b>GOLD</b>	del inglés Initiative Global Obstructive Lung Disease
<b>gpA,</b>	Glicoproteína A
<b>HRB</b>	Hiperreactividad bronquial
<b>IFA,</b>	del inglés indirect immunofluorescence assay, Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta
<b>IL,</b>	Interleuquina
<b>INF-<math>\gamma</math>,</b>	Inmunoforon gamma
<b>ITS,</b>	del inglés Internal Transcribed Spacer.
<b>LBA,</b>	Lavado Broncoalveolar
<b>LDH,</b>	Láctico Deshidrogenasa
<b>LOF,</b>	Lavado Orofaringeo
<b>MCP-1,</b>	del inglés Monocyte chemotactic protein-1, proteína quimiotáctica de monocitos
<b>MMP</b>	Metaloproteinasas de la matriz
<b>MIP-2,</b>	del inglés Macrophage Inflammatory Protein-2, proteína inflamatoria de macrófagos
<b>MSG,</b>	del inglés Major Surface Glycoprotein, proteína mayor de superficie
<b>mtLSU</b>	ARN ribosómico de la subunidad mayor del ribosoma mitocondrial
<b>rRNA,</b>	
<b>NF-<math>\kappa\beta</math>,</b>	del inglés Nuclear Factor $\kappa\beta$ , factor nuclear $\kappa\beta$
<b>OCFA</b>	Obstrucción crónica al flujo aéreo
<b>PcP,</b>	del inglés <i>Pneumocystis</i> Pneumonia, neumonía por <i>Pneumocystis</i>

<b>PCR,</b>	del inglés Polymerase Chain Reaction
<b>RANTES,</b>	del inglés Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
<b>RFLP,</b>	del inglés, Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>SAM,</b>	S-AdenosilMetionina
<b>SCID,</b>	del inglés Severe Combined Immunodeficiency, inmunodeficiencia combinada grave
<b>SEPAR</b>	Sociedad española de neumología y cirugía torácica
<b>SIDA,</b>	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
<b>SIV</b>	del inglés Simian inmunodeficiency virus, virus de la inmunodeficiencia simia.
<b>TAC ,</b>	Tomografía Axial Computarizada
<b>TARGA,</b>	Terapia Antiretroviral de Gran Actividad
<b>TBE,</b>	Tris, Borato y EDTA (tampón)
<b>Th,</b>	Linfocito T helper
<b>Tc,</b>	Linfocito T citotóxico
<b>TLR,</b>	del inglés Toll Like Receptor
<b>TMP-SMX,</b>	Trimetoprim/sulfametoxazol o co-trimoxazol
<b>TNF-<math>\alpha</math>,</b>	del inglés Tumor Necrosis Factor $\alpha$ , factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>TSR,</b>	del inglés Template Supresion Reagent
<b>uPA,</b>	Plasminógeno tipo urokinasa
<b>VEF1</b>	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
<b>VIH,</b>	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
<b>WT,</b>	wild type





## **ANEXO I: Protocolo de extracción de ADN**

1. La muestra previamente digerida a 56°C se lisa con 200 µl de B3. Se agita vigorosamente y se mezcla. Se deja reposar a temperatura ambiente unos minutos.
2. Se añaden 210 µl de Etanol 100% y se agita inmediatamente.
3. Se deposita la muestra previamente tratada en una columna y un tubo colector de 2 ml, ambos rotulados convenientemente. Se centrifuga 1 min a 10000 rpm. Se desecha el líquido del tubo colector.
4. Se añaden 500 µl de BW. Se centrifuga 1 min a 10000 rpm. Desachar el líquido.
5. Se añaden 600 µl de B5 y centrifugar 1 min a 10000 rpm.
6. Se coloca la columna en un tubo colector limpio. Se centrifuga 3 min a máxima velocidad.
7. Se descarta el tubo colector y se coloca la columna en un eppendorf limpio.
8. Se eluye el ADN añadiendo 55 µl de agua ultrapura.
9. Se deja reposar unos minutos y se centrifuga 1 min a máxima velocidad.
10. El ADN obtenido se congela a -20°C hasta su uso.

## Genomic DNA from tissue

### Protocol-at-a-glance (Rev. 14)

#### NucleoSpin® Tissue

1	Prepare sample		Cut 25 mg into small pieces
2	Pre-lyse sample		180 µL T1 25 µL Proteinase K  56 °C, 1–3 h
3	Lyse sample		200 µL B3 70 °C, 10 min
4	Adjust DNA binding conditions		210 µL 96–100% ethanol
5	Bind DNA	 	Load all  11,000 x g, 1 min
6	Wash silica membrane	 1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> 	1 <sup>st</sup> wash      500 µL BW 2 <sup>nd</sup> wash      600 µL B5  11,000 x g, 1 min
7	Dry silica membrane		11,000 x g, 1 min
8	Elute highly pure DNA	 	100 µL BE  RT, 1 min  11,000 x g, 1 min

## ANEXO II: Protocolo de identificación de genotipos de mt LSU rRNA mediante secuenciación directa

Tras la identificación de *P. jirovecii* en una muestra de esputo obtenido de un sujeto con EPOC se procede a la secuenciación del fragmento de ADN amplificado.

Es necesaria la purificación de los productos de PCR mediante cromatografía de exclusión molecular para la obtención de ADN susceptible de ser secuenciado. Se procede con el protocolo que detallamos.

1. Se utiliza una columna por cada muestra
2. Añadimos 650  $\mu$ l de agua destilada-autoclavada en un eppendorf de 1.5 ml
3. Centrifugar durante 1min a 3000 rpm dos veces; secar después el extremo.
4. Añadir a la columna Sephacryl-S400
5. Se coloca de nuevo la columna en el eppendorf para eliminar el buffer y compactar el polímero. Centrifugar 2 min a 3000 rpm. Se descarta el buffer y se seca el extremo de la columna. Este lavado se repite en dos ocasiones más.
6. Añadimos 25  $\mu$ l de ADN amplificado en la columna (añadir lentamente y por el centro de la columna).
7. Se coloca la columna en un tubo eppendorf limpio y rotulado.
8. Se centrifugamos 2,5 min a 3000 rpm
9. Se vuelve a testar el fragmento purificado en gel de agarosa (5  $\mu$ l de ADN + 1,5  $\mu$ l de Blue Juice).

### REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN

Cada reacción de secuenciación debe contener: 5  $\mu$ l de ADN purificado; 4  $\mu$ l de premix (suministrada por Applied Biosystems) y 1  $\mu$ l de primer a 3 pmoles de concentración.

Programa de Secuenciación

3 min a	94°C	}	25 ciclos
10 s	95°C		
5 s	50°C		
4 min a	60°C	ilimitado a	4°C

### PRECIPITACIÓN DEL PRODUCTO DE SECUENCIACIÓN

1. Rotulamos un tubo eppendorf por cada muestra.
2. Se añaden:
  - 9,5  $\mu$ l de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  2 mM
  - 27,5  $\mu$ l de etanol absoluto a 95%
  - 10  $\mu$ l de la reacción de secuenciación.
3. Se incuba 12 min a RT y se centrifuga 20 min a 14000rpm

4. Se elimina la solución de etanol, procurando no tocar el pellet y usando punta de pipeta plana.
5. Añadir 125  $\mu$ l de etanol al 70%
6. Se centrifuga durante 10 min a 14000 rpm
7. Decantar la solución de etanol.
8. Dar un pulso y eliminar al máximo con una punta estirada el sobrenadante
9. Incubar durante 10-15 minutos a 37°C para que se evapore por completo el etanol y dejar el pellet bien seco.

Antes de realizar la electroforesis se añaden 25  $\mu$ l de TSR, y se incuba 10 min a RT.

Posteriormente damos un vórtex a cada tubo, desnaturalizamos 3 min a 94°C en bloque seco.

Pulso de centrifuga a 14000 rpm, vórtex, y se cambia a tubos eppendorf de 0,5  $\mu$ l.

Las muestras están listas para la electroforesis en el secuenciador.

## ANEXO III: Protocolos de las técnicas de ELISA

### A) ELISA IL-8

La determinación de la citoquina IL-8 se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante y fue suministrado por el laboratorio Endogen.

Se procede a la preparación de los reactivos:

#### Solución de Lavado

Se diluye la solución de lavado concentrada (30X) a 1X en agua destilada

#### Preparación de la curva estándar:

Se reconstituye la solución de IL-8 concentrada siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se preparan las diluciones seriadas pasando 160 µl de IL-8 de concentración conocida y se diluye con 240 ml de diluyente de estándar para la preparación de la curva como se indica en la figura.

#### Preparación de las muestras

Las muestras de esputo se utilizan sin diluir

Las muestras de suero se diluyen 1:2.

Protocolo:

1. Se añade a cada pocillo 100 µl de muestra problema o estándar de la curva.
2. Se cubre la placa y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora
3. Se lava la placa por 3 veces con solución de lavado 1X.
4. Se incuba la placa con 50 µl de anticuerpo biotinilado durante 1 hora.
5. Se lava la placa por 3 veces con solución de lavado 1X.
6. Se añade estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (100 µl por pocillo) y se incuba durante 30 minutos.
7. Se lava la placa por 3 veces con solución de lavado 1X.
8. Se incuba con 100 µl de solución sustrato TMB durante 30 min al abrigo de la luz durante 30 min.
9. Se añaden 100 µl de solución de parada
10. Se determina la concentración de IL-8 en un lector de ELISA a 450 nm.

## B) ELISA IL-6

La determinación de la citoquina IL-6 se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante y fue suministrado por el laboratorio Endogen.

Se procede a la preparación de los reactivos:

### Solución de Lavado

Se diluye la solución de lavado concentrada (30X) a 1X en agua destilada

### Preparación de la curva estándar:

Se reconstituye la solución de IL-6 concentrada siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se preparan las diluciones seriadas pasando 160  $\mu$ l de IL-6 de concentración conocida y se diluye con 240  $\mu$ l de diluyente de estándar para la preparación de la curva.

Las concentraciones utilizadas para la recta patrón son: **400; 160; 64; 25,6; 10,24; 4,096** pg/ml

### Preparación de las muestras

Las muestras de esputo y de suero se utilizan sin diluir.

Protocolo:

1. Se añade a cada pocillo 50  $\mu$ l anticuerpo biotinilado
2. Las muestras se incuban añadiendo 50  $\mu$ l de diluyente y 80  $\mu$ l de muestra problema.
3. La curva patrón se incuba añadiendo 80  $\mu$ l de diluyente y 50  $\mu$ l de estándar.
4. Cubrir la placa y se incuba a temperatura ambiente durante 2 horas.
5. Se lava la placa por 3 veces con solución de lavado 1X.
6. Se añade streptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (100  $\mu$ l por pocillo) y se incuba durante 30 minutos.
7. Se lava la placa por 3 veces con solución de lavado 1X.
8. Se incuba con 100  $\mu$ l de solución sustrato TMB durante 30 min al abrigo de la luz durante 30 min.
9. Se añaden 100  $\mu$ l de solución de parada
10. Se determina la concentración de IL-6 en un lector de ELISA a 450 nm.

### C) TNF-alpha

La determinación del TNF-alpha se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante y fue suministrado por el laboratorio Endogen.

Se procede a la preparación de los reactivos:

#### Solución de Lavado

Se diluye la solución de lavado concentrada (30X) a 1X en agua destilada

#### Preparación de la curva estándar:

Se reconstituye la solución de TNF-alpha liofilizada con agua bidestilada siguiendo las indicaciones del fabricante. De esta solución se toman 200 µl y se diluye con 200 µl de diluyente del estándar resultando a una concentración de 1000 pg/ml. Desde esta solución se preparan diluciones seriadas a una concentración final para la recta patrón de: **500; 250; 125; 62,5; 31,2; 1,6; 7,8** pg/ml

#### Preparación de las muestras

Las muestras de esputo y de suero se utilizan sin diluir.

Protocolo:

1. Las muestras se incuban añadiendo 50 µl de diluyente y 80 µl de muestra problema.
2. La curva patrón se incuba añadiendo 80 µl de diluyente y 50 µl de estándar.
3. Cubrir la placa y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora.
4. Se lava la placa por 3 veces con solución de lavado 1X.
5. Se añade a cada pocillo 100 µl anticuerpo biotinilado.
6. Se lava la placa por 3 veces con solución de lavado 1X
7. Se añade streptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (100 µl por pocillo) y se incuba durante 30 minutos.
8. Se lava la placa por 3 veces con solución de lavado 1X.
9. Se incuba con 100 µl de solución sustrato TMB durante 30 min al abrigo de la luz durante 30 min.
10. Se añaden 100 µl de solución de parada
11. Se determina la concentración de IL-6 en un lector de ELISA a 450 nm.

#### **D) MCP-1**

La determinación de MCP-1 se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante y al igual que el resto de los kits fue suministrado por el laboratorio Endogen.

Se procede a la preparación de los reactivos:

##### Solución de Lavado

Se diluye la solución de lavado concentrada (30X) a 1X en agua destilada

##### Preparación de la curva estándar:

Se reconstituye la solución de MCP-1 concentrada siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se preparan las diluciones seriadas pasando 100 ml de MCP-1 de concentración conocida y se diluye con 300 ml de diluyente de estándar para el punto más concentrado de la curva.

Para el resto de las diluciones se 160 ml del tubo anterior y se diluye con 240 ml de diluyente.

##### Preparación de las muestras

Las muestras de esputo y/o suero se analizan sin diluir.

Protocolo:

1. Se añade a cada pocillo 50  $\mu$ l de solución diluyente y 50  $\mu$ l de la muestra problema o estándar de la curva.
2. Cubrir la placa y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora
3. Se lava la placa por 3 veces con solución de lavado 1X.
4. Se incuba la placa con 100  $\mu$ l por pocillo de anticuerpo biotinilado durante 1 hora.
5. Se lava la placa por 3 veces con solución de lavado 1X.
6. Se añade streptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (100  $\mu$ l por pocillo) y se incuba durante 30 minutos.
7. Se lava la placa por 3 veces con solución de lavado 1X.
8. Se incuba con 100  $\mu$ l de solución sustrato TMB durante 30 min al abrigo de la luz.
9. Se añaden 100  $\mu$ l de solución de parada
10. Se determina la concentración de MCP-1 en un lector de ELISA a 450 nm.

# ANEXO IV Cuaderno de recogida de datos

## CASE REPORT FORM (CRF)

1. Investigator code <sup>(1)</sup>

_/_/___
_/_/___/___ _

2. Case number <sup>(2)</sup>

3. Date of enrolment (d/m/y)

4. Major group

Chronic pulmonary disease

Blood donor

*P. carinii* pneumonia

Other (specify)


## PATIENT DATA

5. Patient's Initial <sup>(3)</sup>

6. Sex (M/F)

7. Race (White, black, Oriental, Other)

8. Date of birth (d/m/y)

9. Town of birth

10. Country of birth

11. Town of residence

12. Country of residence

_/_/___/___ _

## MEDICAL HISTORY

Yes No

13. DIABETES

--	--

14. HEPATIC IMPAIRMENT (transaminases > 2 times upper limit of normal range)

--	--

15. RENAL IMPAIRMENT (serum creatinine > 2 mg/dl)

--	--

16. MALIGNANCIES (if yes, specify)

--	--

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

17. OTHERS (if yes, specify)

--	--

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

18. Transfusion recipient

--	--

19. Risk factor for HIV infection

--	--

20. Smoker (if yes, specify number of cigarettes per day)

--	--

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

21. Alcohol Intake (if yes, specify g/day)

--	--

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**NOTES**

<sup>1</sup>Use the Participant No. allocated by the consortium:

Seville	EC1	Lyon	EC4	Toulouse	EC7	Lauren	EC10
Lille	EC2	Copenhagen	EC5	Paris	EC8	Lisbon	EC11
Oxford	EC3	Amiens	EC6	Rome	EC9		

<sup>2</sup>Use the Participant No. followed by a correlative number (one for each subject included in the study) allocated by your Centre. For example: fourth patient of Seville: Case number EC1/04

<sup>3</sup> Name & surname

**CHRONIC PULMONARY DISEASE HISTORY**

Yes No

**22. PULMONARY DISEASE**

--	--

22.1. Chronic bronchitis

--	--

22.2. Emphysema

--	--

22.3. Bronchiectasis

--	--

22.4. Chronic obstructive asthma

--	--

22.5. Cystic fibrosis

--	--

22.6. Other (if yes, specify)

--	--

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**23. Pulmonary disease exacerbation <sup>(4)</sup> at this assessment**

--	--

if yes, specify: mild, moderate or severe

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**24. Evidence of any pulmonary infection at this assessment**

--	--

If yes, specify aetiology

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

If yes, specify method of identification

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**25. Use of corticosteroids within the previous 6 months**

--	--

If yes, specify : inhaled corticosteroid (IC) / oral corticosteroid (OC) / both (BO)

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

If yes specify: total number of days under this treatment within the last six months

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**26. Use of other immunomodulating agents<sup>(5)</sup> within the previous 6 months**

--	--

If yes, specify the agent

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**27. Previous use of cotrimoxazole**

--	--

If yes specify: total number of days under this treatment and total dose of sulfamethoxazole within the last six months

Days: \_\_\_\_ Dose (g):

\_\_\_\_\_

**28. Use of other drugs with anti-P.carinii activity<sup>(6)</sup> within the previous 6 months**

--	--

If yes, specify the agent

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**NOTES**

<sup>4</sup> Exacerbation of COPD is defined as a sustained worsening of the patients condition, from the stable state and beyond normal day-to-day variations, that is acute in onset and necessitates a change in regular medication in a patient with underlying COPD.

Staging COPD exacerbations:

- Mild: Patient has an increased need for medication, which he/she can manage in own normal environment
- Moderate: Patient has an increased need for medication and feels the need to seek additional medical assistance
- Severe: Patient/caregiver recognised obvious and/or rapid deterioration in condition, requiring hospitalisation

<sup>5</sup> Including cytotoxic chemotherapeutic agents

<sup>6</sup> Including pentamidine, dapson, atovaquone, primaquine, clindamicine, pyrimethamine, macrolides

**HEMATOLOGY/BIOCHEMISTRY/ARTERIAL GASES/CHEST X RAY**

29. Haemoglobin (g/dl)

--

34. pH

--

30. WBC x 10<sup>9</sup>/l

--

35. pO<sub>2</sub> (mmHg)

--

31. Neutrophils x 10<sup>9</sup>/l

--

36. pCO<sub>2</sub> (mmHg)

--

32. Lymphocytes x 10<sup>9</sup>/l

--

37. Serum creatinine (mg/dl)

--

33. Chest X-ray (specify: 1 to 8) <sup>(7)</sup>.

--

**OPTIONAL TEST**

Not Done  
done

**38. IMMUNOLOGY**

--	--

If done, specify:

37.1. Date of test (d/m/y)

____/____/____ ____

37.2. CD4 cell/mm<sup>3</sup>

37.3. CD8 cell/mm<sup>3</sup>

Not Done  
done

**39. HIV SEROLOGY**

--	--

If done, specify:

38.1. Date of test (d/m/y)

____/____/____ ____

38.2. Result (pos/neg)

Not Done  
done

**40. SPIROMETRY**

--	--

If done, specify:

(within the previous six months)

39.1. Date of test (d/m/y)

____/____/____ ____
------------------------

39.2. FEV1, % predicted

--

39.3. FEV1/VC, % predicted

--

39.4. FEV1/FCV, percent

--

Not Done  
done

**41. MICROBIOLOGY (sputum analysis)**

--	--

If done, specify:

40.1. Date of test (d/m/y)

____/____/____ ____
------------------------

40.2. Sputum staining

--

40.3. Microbiological identification (yes/no)

--

40.4. If yes, specify micro-organism

--

**NOTES**

<sup>(7)</sup> 1 = normal; 2 = alveolar infiltrate; 3 = interstitial infiltrate; 4 = mixed infiltrate; 5 = pleural effusion; 6 = bronchiectasis; 7, bullae;

8, other (specify)

**LOCAL DIAGNOSIS OF P. CARINII**

	Pos	Ne	ND	
42. Sputum staining (if done, specify method)				_____
43. Sputum PCR				_____
44. BAL staining (if done, specify method)				_____
45. BAL PCR				_____
46. Other (if done, specify sample and method)				_____

BAL, bronchioalveolar lavage

ND, not done

**STORED SAMPLES**

	Yes	No	No. of samples	Codes of samples <sup>(8)</sup>
47. Sputum (SP)				
48. Oralpharyngeal samples (OP)				
49. Serum (SE)				
50. BAL (BA)				
51. Activated Lymphocytes (LY)				
52. Other (if yes, specify sample) (OT)				_____

**COMMENTS:** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## **NOTES**

<sup>(8)</sup> Case number/code of sample followed by a correlative number (one for each aliquot). For example: first aliquot of sputum for patient 4 of Seville: Case number EC1/04; Code of sample EC1/04/SP1

## **GUIDELINES FOR COMPLETING THE CASE REPORT FORM (CRF)**

- Use a BLACK biro or ballpoint pen.
- Please return by mail white top copy of the completed pages to the Co-ordinator Centre.
- The yellow copy of the completed pages will be retained at your Centre.
- If it is necessary to correct data, cross out the incorrect data with a single line and initial the correction. Do not use tipp-ex correction fluid.

## ANEXO V: Hoja de información/consentimiento informado

### Impacto de la colonización por *Pneumocystis* en la fisiopatología de la enfermedad pulmonar crónica.

La siguiente información describe el estudio a realizar y las consideraciones más importantes de la infección por *P. jirovecii*

Por favor lea cuidadosamente esta información y no dude en preguntar a su médico si no entiende algún punto de la misma.

***Pneumocystis* es un hongo atípico y poco virulento que se encuentra muy extendido entre los humanos y otras especies de mamíferos a lo largo del mundo. Este microorganismo puede producir una infección respiratoria a pacientes que, por diferentes causas, padecen alteraciones de su sistema inmunológico que es el encargado de la defensa frente a las infecciones. Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que personas sin alteración de su sistema inmunológico pueden ser portadoras de este agente sin llegar a padecer neumonía. Esto se ha observado sobre todo en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas (10-40%) sin que hasta el momento se conozca el papel que puede desempeñar en la evolución de su enfermedad**

El **objetivo** de este estudio es aportar información sobre el posible efecto de *Pneumocystis jirovecii* sobre la fisiopatología de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica a través de la respuesta inmune que induce a nivel local y sistémico en estos pacientes con EPOC.

Los **procedimientos** del estudio consisten en la toma de unas muestras de esputo que el paciente expulsará espontáneamente para comprobar si es portador de este microorganismo y realizar un análisis del mismo. Además se extraerán una muestra de sangre para realizar el estudio inmunológico del paciente.

Los datos de los estudios científicos disponibles hasta la fecha apoyan que en personas sin alteración del sistema inmune este agente no provoca alteraciones importantes y, por tanto, no se precisa tratamiento para erradicarlo. Por tanto, usted no recibirá tratamiento en caso que se detecte el patógeno. Si la evolución clínica de su enfermedad hiciese sospechar que este microorganismo puede estar causando una evolución desfavorable usted recibirá tratamiento específico frente al mismo, y recibirá todos los cuidados médicos necesarios para el control de su enfermedad. A todos los participantes en el estudio se les pide su aceptación por escrito.

El Dr. \_\_\_\_\_ es el investigador responsable del estudio y está a su disposición en caso de que tuviera alguna duda, pregunta o problema.

La confidencialidad de los datos relacionados con este estudio será respetada, a los cuales solo tendrá acceso el médico investigador, persona encargada de su control.

La participación es voluntaria y en cualquier momento puede retirarse del estudio sin que esto altere la relación con su médico ni produzca perjuicio sobre su seguimiento. Si esta información le parece suficiente y está de acuerdo en participar en el estudio por favor firme el formulario de consentimiento escrito. **MUCHAS GRACIAS.**

**ANEXO V**  
**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**Impacto de la colonización por *Pneumocystis* en la fisiopatología de la enfermedad pulmonar crónica.**

**Por favor marque el recuadro apropiado**

Si No

➤ ¿ Ha leído la hoja informativa de consentimiento que se le ha entregado? 

--	--

➤ ¿Ha recibido suficiente información sobre el estudio y ha tenido la oportunidad de preguntar sobre el mismo obteniendo respuestas satisfactorias a las preguntas efectuadas? Si No

--	--

➤ ¿Con quién ha hablado? Dr \_\_\_\_\_

➤ ¿Está de acuerdo en que su participación es voluntaria y que puede retirarse del estudio:

- en cualquier momento?

- sin tener que dar explicaciones?

Si No

- sin que esto repercuta en mis cuidados médicos?

--	--

➤ ¿Está de acuerdo en que su historial médico sea examinado por personal autorizado manteniendo la confidencialidad de su identidad y que esta no sea divulgada ?

Si No

--	--

He contestado SI a todas las preguntas arriba indicadas y estoy de acuerdo en participar libremente en el estudio.

Firma del participante: \_\_\_\_\_ Fecha:

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

(padre o representante legal en caso de ser menor de edad) d m a

Nombre del participante en mayúsculas: \_\_\_\_\_-

\_\_\_\_\_

Firma del testigo: \_\_\_\_\_ Fecha:

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

d m a

Nombre del testigo en mayúsculas:

\_\_\_\_\_