

# Universidad Católica de Santa María

## Facultad de Medicina Humana

### Escuela Profesional de Medicina Humana



**EFECTO DEL FILGRASTIM SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CD32 Y M-CSFR EN  
MACRÓFAGOS MURINOS COMO TRATAMIENTO DE LA PROTEINOSIS  
ALVEOLAR PULMONAR- AREQUIPA, 2020**

Tesis presentada por la Bachiller:

**Lope Choque, Yulisa Yasmina**

para optar el Título Profesional de:

**Medico Cirujana**

Asesor:

**Dr. Salinas Gamero, Jesús Eduardo**

**Arequipa – Perú**

**2020**

10/3/2020

Correo: YULISA LOPE - Outlook



Universidad Católica  
de Santa María

70

AREQUIPA-PERU

(51 54) 382038 <http://www.ucsm.edu.pe> [facebook.com/ucsm.edu.pe/](https://facebook.com/ucsm.edu.pe/)

**INFORME DICTAMEN BORRADOR DE TESIS**  
**DECRETO N° 013 - FMH-2020**

Visto el Borrador de Tesis titulado

**"EFECTO DEL FILGRASTIM SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CD32 Y M-CSFR EN MACRÓFAGOS MURINOS  
COMO TRATAMIENTO DE LA PROTEINOSIS ALVEOLAR PULMONAR - AREQUIPA. 2020"**

Presentado por el (la) Sr(ta)

**LOPE CHOQUE, YULISA YASMINA**

Nuestro dictamen es

FAVORABLE

OBSERVACIONES

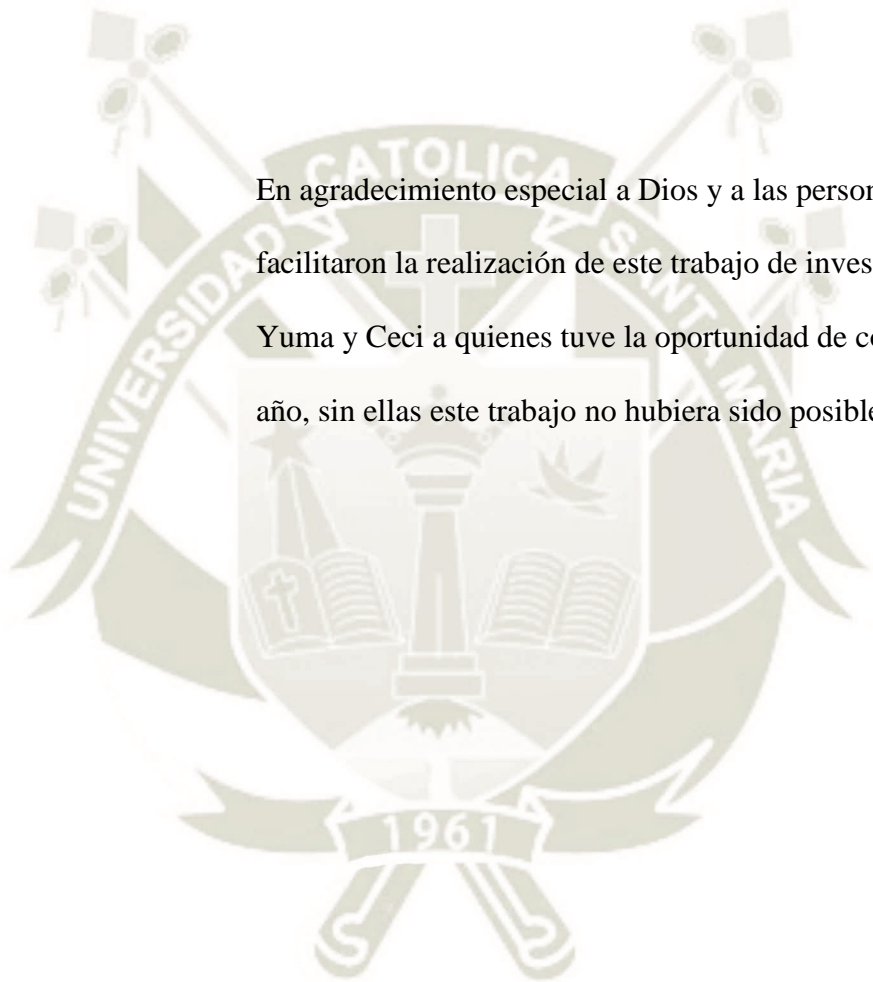
Arequipa, 09 Marzo 2020

DR. MIGUEL FERNANDO FARIÁN  
DEFRATTO

DR. RAFAEL FREDY TAPIA PÉREZ

DRA. ESTILVA BRAVONTE CABALLERO

## AGRADECIMIENTOS



En agradecimiento especial a Dios y a las personas que facilitaron la realización de este trabajo de investigación, Yuma y Ceci a quienes tuve la oportunidad de conocer este año, sin ellas este trabajo no hubiera sido posible.

## DEDICATORIA

A quienes hicieron posible este proyecto, a pesar de todas las dificultades que se presentaron en el camino, muchas gracias por el apoyo y la paciencia

A quienes me enseñaron que no hay imposibles, a pesar que el camino se vea difícil, si uno tiene la suficiente actitud y se esfuerza lo necesario

A quienes contribuyeron en mi formación, alentándome a no rendirme, y que cada dificultad es una oportunidad

A quienes me enseñaron que quien viene a consulta no solo es un paciente, sino un hermano que necesita nuestra ayuda

A quienes me enseñaron que la amabilidad es gratis, muy eficaz y todos podemos ejercerla

A quienes me enseñaron lo infinito y desprendido que es el amor

A quienes me inspiraron y fueron un modelo a seguir en mi carrera profesional

## RESUMEN

**Introducción:** El lavado pulmonar completo ha sido la terapia de primera línea desde la década de los años sesenta para la proteinosis alveolar pulmonar y que ha demostrado buenos resultados en los pacientes, actualmente se están desarrollando nuevas terapias farmacológicas prometedoras. Filgrastim es un factor estimulante de colonias de granulocitos, usado en hematología y oncología, pero hay experiencia clínica del uso de este fármaco acompañado del lavado pulmonar completo brinda resultados favorables en esta patología, además de disponibilidad y accesibilidad en nuestro país. **Objetivos:** Evaluar el efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 y M-CSFR en macrófagos murinos sanos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar. **Materiales y métodos:** Estudio prospectivo, experimental, de corte transversal. Se utilizó 12 murinos (ratones), 7 murinos participan en el estudio in vitro y 5 participan en el estudio in vivo; se extrajo un trozo de tejido pulmonar y lavado pulmonar de cada murino, luego se realizó la extracción de RNA para la obtención de cDNA mediante la técnica de transcripción inversa acoplada y amplificación por PCR (RT-PCR) para los genes de CD32, M-CSFR y el gen de referencia beta actina; y la electroforesis respectiva. **Resultados:** No hubo diferencia significativa ( $p>0.05$ ) entre el nivel de expresión de CD32 y M-CSFR en el tejido pulmonar obtenido de ratones tratados con filgrastim a una dosis de 300ng/día, no hubo diferencia significativa ( $p>0.05$ ) entre el nivel de expresión de CD32 y M-CSFR en el lavado pleural obtenido de ratones tratados con filgrastim in vitro a una dosis de 100ng/ml; CD32 y M-CSFR no se expresaron en el estudio electroforético. **Conclusiones:** El filgrastim en este estudio no tuvo efecto sobre la expresión de CD32 y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar.

**PALABRAS CLAVE:** Proteinosis alveolar pulmonar, filgrastim, macrófagos, CD32, receptor del factor estimulante de colonias macrófago

## ABSTRACT

**Background:** Whole-lung lavage has been the first-line therapy since the sixties for pulmonary alveolar proteinosis and has shown good results in patients, currently promising new drug therapies are being developed. Filgrastim is a granulocyte colony stimulating factor, used in hematology and oncology, but there is clinical experience of the use of this drug accompanied by whole-lung lavage with favorable results in this pathology, also it is cheap and available in our country. **Objectives:** To evaluate the effect of filgrastim on the activation of CD32 y M-CSFR in healthy murine macrophages as a treatment of pulmonary alveolar proteinosis. **Materials and methods:** Prospective, experimental and transversal study. Twelve murine (mice) were used, 7 murine participate in vitro study and 5 participate in vivo study; a piece of lung tissue or lung lavage was removed from each murine, then RNA extraction was performed to obtain cDNA by the technique of reverse coupled transcription and PCR amplification (RT-PCR) for the CD32, M-CSFR and beta actin reference gene; and the respective electrophoresis. **Results:** There was no significant difference ( $p > 0.05$ ) between the level of CD32 and M-CSFR expression in lung tissue obtained from mice treated with filgrastim at a dose of 300ng/day, there was no significant difference ( $p > 0.05$ ) between the level of expression of CD32 and M-CSFR in pleural lavage obtained from mice treated with filgrastim in vitro at a dose of 100ng/ml; CD32 and M-CSFR were not expressed in the electrophoretic study. **Conclusion:** Filgrastim in this study had no effect on the expression of CD32 and M-CSFR in murine macrophages as a treatment of pulmonary alveolar proteinosis.

**KEY WORDS:** Pulmonary alveolar proteinosis, filgrastim, macrophages, CD32, M-CSFR

## INTRODUCCIÓN

La proteinosis alveolar pulmonar (PAP) es un síndrome raro definido por la acumulación de sustancia surfactante (material lipoproteico) en los alveolos pulmonares y en las vías respiratorias terminales (1), lo cual produce una insuficiencia respiratoria de tipo hipoxémica y aumenta el riesgo de infecciones secundarias (32).

La prevalencia de esta patología es de 7 casos por millón de personas en Estados Unidos y Japón según un estudio realizado en el año 2018. Asimismo, la prevalencia de la PAP autoinmune es de 6,2 casos por millón de personas y la incidencia es 0,49 casos por millón de personas según un estudio japonés (3). Y la PAP secundaria tiene una prevalencia del 0,5 por millón de personas y una incidencia de 0,05 por millón de personas (1). Los factores de riesgo asociados a esta patología son: Humo del tabaco en la mayoría de los casos, polvos orgánicos e inorgánicos, gases, etc.

La PAP ha tenido diversas formas de clasificación, sin embargo, actualmente se clasifica en *PAP autoinmune*, caracterizada por niveles altos de auto anticuerpos anti factor estimulante de colonias granulocito macrófago (anti FEC-GM) en los pulmones, representa un 90% de todos los casos de PAP; *PAP hereditaria o congénita*, caracterizado por mutaciones en los genes del receptor del factor estimulante de colonias granulocito macrófago (FEC-GM) con una frecuencia menor al 1%; y *PAP secundaria*, resultado de enfermedades subyacentes que alteran el número o la función de los macrófagos alveolares con una frecuencia del 8 a 9%, dentro de las patologías subyacentes la más frecuentemente asociada son los desórdenes hematológicos (síndrome mielodisplásico) (1,29,31).

En esta patología se ve alterada la eliminación de la sustancia surfactante; debido a que la señalización del FEC-GM se encuentra alterada por la presencia de auto anticuerpos anti FEC-GM o mutaciones en los receptores del FEC-GM en el macrófago alveolar, o por la presencia de enfermedades subyacentes que alteran la función de los macrófagos alveolares (1). El FEC-GM juega un papel muy importante en la PAP, porque regula la capacidad de absorción y catabolismo de los macrófagos alveolares, función necesaria para el equilibrio del surfactante pulmonar (29), este proceso se realiza mediante la activación de múltiples

vías de señalización, incluida la activación del factor de transcripción llamado PU.1 y el receptor de peroxisoma proliferador activado gamma (PPAR $\gamma$ ) y otros (32).

La edad de inicio de los síntomas, la forma de presentación y la gravedad depende del tipo de PAP. Los pacientes con PAP autoinmune, la forma de presentación más frecuente, son personas de la tercera a quinta década de la vida con disnea de esfuerzo, tos con o sin expectoración blanco espumoso, fatiga y/o pérdida de peso; al examen físico se ausculta crépitos y/o cianosis en un pequeño número de pacientes; en la radiografía de tórax se observa infiltrados simétricos en el tercio medio e inferior de ambos campos pulmonares y en la tomografía computarizada se evidencia opacidades difusas en vidrio esmerilado asociados a un engrosamiento del septo interlobular (1,32). La PAP al ser una patología poco frecuente, es confundida por otras enfermedades más frecuentes, tales como neumonía o asma, sin embargo, al no responder al tratamiento antibiótico en el caso de la neumonía o terapia broncodilatadora en el asma, hace necesario la reconsideración de nuevos diagnósticos (32). Pacientes con PAP hereditaria presentan sintomatología similar a la PAP autoinmune, no obstante, la edad de inicio es en la infancia; y pacientes con PAP secundaria se presentan junto a una condición clínica subyacente y en el contexto de la exposición ambiental.

El lavado pulmonar completo se ha practicado por más de 50 años como tratamiento de primera línea, bajo anestesia general utilizando un tubo endotraqueal de doble lumen y suero fisiológico (1,14,16). Sin embargo, con el paso de los años se empezó a conocer más sobre la fisiopatología de esta patología, y por consiguiente se conocieron nuevas líneas terapéuticas, entre ellas el tratamiento con FEC-GM, tras el descubrimiento de que los ratones deficientes de FEC-GM desarrollaban un trastorno parecido a la PAP y que la administración de FEC-GM resuelve el problema, con esos datos se dedujo que el tratamiento con FEC-GM podría ser efectiva en personas con esta patología (1)

Filgrastim es un factor estimulante de colonias granulocito (FEC-G) recombinante humano producido por ingeniería genética en *Escherichia coli*. El fármaco actúa sobre la membrana celular de las células progenitoras hematopoyéticas y en los neutrófilos maduros, mediante el aumento de la producción de neutrófilos en la médula ósea (34). Filgrastim es usado en niños y adultos con leucemia mieloide aguda post quimioterapia, neutropenia asociada al tratamiento de la hepatitis C, neutropenia post quimioterapia, y otros (34). Aunque su uso en

los síndromes mielodisplásicos y la leucemia se debe considerar como experimental en espera de la disponibilidad de más datos clínicos (20). Contraindicado en pacientes con antecedentes de reacción alérgica grave a FEC-G humano como filgrastim o pegfilgrastim o cualquier componente de la formulación del fármaco. La reacción adversa más frecuente es el dolor óseo en el 20% de los casos que puede ser controlado con analgésicos (20); no hay información acerca de sobredosis masivas con filgrastim y el medicamento se puede administrar por vía subcutánea o endovenosa. Actualmente en nuestro país, el filgrastim es usado en el campo de la hematología y oncología; es un fármaco que está a nuestro alcance, porque es barato y disponible en los hospitales públicos y clínicas privadas.

El uso de fármacos tales como el sargramostim ya sea como alternativa terapéutica o tratamiento complementario al lavado broncoalveolar para la PAP tiene varios años de vigencia a nivel mundial, sin embargo, como esta patología es poco frecuente en el mundo y en nuestro país, el sargramostim no es fácil de conseguir en nuestro país, y se tiene que comprar del extranjero y su costo es muy elevado.

Considerando que hay experiencia clínica local en el manejo de ésta patología con filgrastim y resultados favorables. Es el propósito de este trabajo evaluar el efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar en el laboratorio. Datos que serán documentados en un estudio experimental, y servirá como precedente para el uso del filgrastim como alternativa terapéutica a sargramostim, por ello, si se presentan casos de proteinosis alveolar pulmonar en nuestro país se podría usar como tratamiento a filgrastim acompañado del lavado pulmonar completo.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
INTRODUCCIÓN .....	vi
CAPITULO I MATERIALES Y MÉTODOS .....	1
CAPITULO II RESULTADOS .....	10
CAPITULO III DISCUSIÓN Y COMENTARIOS .....	26
CAPITULO VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
ANEXOS.....	41
ANEXO 1 DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA.....	42
ANEXO 2 PROYECTO DE TESIS.....	48
ANEXO 3 MATRIZ DE SISTEMATIZACION DE DATOS.....	88
ANEXO 4 ORDEN DE USO DE BIOTERIO.....	90

## ÍNDICE DE TABLAS Y/O GRAFICOS

<b>TABLAS</b>	<b>Páginas</b>
N°1 Relación entre la expresión de actina, CD32 y M-CSFR para ratón control	15
N°2 Relación entre la expresión de actina, CD32 y M-CSFR para tejido pulmonar	16
N°3 Relación entre la expresión de actina, CD32 y M-CSFR para lavado pleural	17
N°4 Concentración de RNA en macrófagos	19
 <b>GRÁFICOS</b>	
N°1 Cultivo celular de lavado pleural murino	11
N°2 Cultivo celular de lavado broncoalveolar murino	12
N°3a Viabilidad celular del lavado pleural en murino	13
N°3b Viabilidad celular del lavado pleural en murino	14
N°4 Concentración de RNA en macrófagos	18
N°5 Expresión de beta actina en tejido pulmonar de murinos	20
N°6 Expresión de beta actina en lavado pleural de murinos	21
N°7 Expresión de CD32 en tejido pulmonar de murinos	22
N°8 Expresión de CD32 en lavado pleural de murinos	23
N°9 Expresión de M-CSFR en tejido pulmonar de murinos	24
N°10 Expresión de M-CSFR en lavado pleural de murinos	25



## **CAPITULO I**

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Técnicas, instrumentos y materiales de verificación

#### Técnicas:

- a. **Población de estudio:** Este proyecto fue evaluado por el Comité Institucional de Ética de Investigación de la Universidad Católica de Santa María, los murinos fueron comprados del Bioterio de la misma universidad. Se usaron cinco murinos (ratones) sanos, con un peso entre 40 a 50 gramos, entre machos y hembras.
- *Estudio in vivo:* Se tomaron cinco murinos al azar, de los cuales uno fue el control, que no recibió ningún fármaco; y los cuatro restantes, recibieron 300ng/día de filgrastim diluido en suero fisiológico, el primer ratón recibió una dosis, el segundo ratón recibió dos dosis, el tercer ratón recibió tres dosis y el cuarto ratón recibió cuatro dosis de filgrastim por vía subcutánea. Posterior a ello se realizó la eutanasia de los murinos mediante dislocación cervical. Se realizó la disección de la cavidad torácica y se tomaron muestras de tejido pulmonar de cada murino, en total cinco muestras.
  - *Estudio in vitro:* Se tomaron siete murinos al azar, de los cuales dos fueron controles. Luego se efectúa la eutanasia de los murinos mediante dislocación cervical, después se realizó la disección de la cavidad torácica e inyección-aspiración de suero fisiológico 2 ml a través del diafragma. Se obtienen en total 7 muestras de lavado pleural.
- b. **Cultivo celular:** Las siete muestras provenientes del estudio in vitro del lavado pleural fueron cultivados en placas de seis pozos en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado con Suero Fetal Bobino (SFB) al 10% y Meropenem a 50 ug/mL. Se usó en promedio 400 000 macrófagos del lavado pleural por pozo, luego se agregó el fármaco filgrastim a una concentración de 100 ng/mL

luego 24 horas a cinco pozos (cinco murinos) y a dos pozos (dos murinos) no se agregó ningún fármaco, quedando como controles. El conteo celular se realizó utilizando la cámara de Neubauer a las 48 horas post administración del fármaco.

- c. **Extracción de RNA y análisis:** Para el estudio in vivo, se tomó un pequeño trozo de tejido pulmonar de cada murino y se homogeneizó con una tijera quirúrgica al interior de micro tubos de 1.5 mL con 1mL de TRIzol®. Para el estudio in vitro, se retiró el medio DMEM de las placas de 6 pozos y se lavó con Buffer Fosfato Salino (PBS); se agregó 1 mL de TRIzol® a cada pozo y se utilizó un Scrapper para despegar las células de la superficie de cultivo. Seguidamente, se recuperó las células y se pasaron a un tubo de 1.5 mL. La extracción de RNA total con TRIzol fue realizado de acuerdo al protocolo TRI Reagent® Protocol para ambos tipos de estudios. El RNA extraído fue rotulado con un código y almacenado a temperatura de -20°C hasta su posterior análisis. Luego se realizó la medición del RNA mediante el NanoPhotometer®NP80 siguiendo las instrucciones del fabricante, para determinar la concentración de RNA y la pureza de las muestras.
- d. **Síntesis de cDNA:** La síntesis de cDNA se realiza usando un kit comercial OneScript® cDNA synthesis kit de acuerdo a las instrucciones del fabricante en el termociclador. Se tomó de 5ul de RNA de cada muestra, oligo(Dt) 1ul, dNTP MIX 1ul, 5X RT Buffer 4ul, RNaseOFF Ribonuclease Inhibitor 0,5ul, RTase 1ul y Nuclease-free H<sub>2</sub>O para un volumen total de 20ul en microtubos de 0.2 mL; posterior a ello se rotularon las muestras con códigos. El cDNA sintetizado fue almacenado a -20°C para su posterior análisis por PCR.
- e. **Amplificación por PCR convencional:** La amplificación se realizará utilizando 2X PCR Taq Plus MasterMix y los primers antes mencionados. Se usará cDNA, primer específico (CD32, M-CSFR y  $\beta$  actina) y 2X PCR Taq Plus MasterMix en un tubo de 0.2 mL para cada muestra, el programa de PCR fue el siguiente: 95°C por 5 minutos, 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos y 72°C por 10 minutos por 45 ciclos. Posterior a ello se almacenó las muestras a -20°C para su

posterior comprobación en gel de agarosa 1.5%. Los primers se buscaron de artículos científicos (38, 39) y se calculó la temperatura de Annealing adecuada utilizando el programa bioinformático NEB®Tm Calculator. La secuencia de primers que se usaron fue la siguiente:

PRIMER	FORWARD	REVERSE
<b>CD32</b>	5'-GGAGAGCAACTGGACTGTCC-3'	5'-ACTGTGGTTGGCTTTTGGGA-3'
<b>M-CSFR</b>	5'-TCCACCTCCACTGGCATCTG-3'	5'-ATGCTGTATGCTAGGGTAGGC-3'
<b>BETA ACTINA</b>	5'-TCATGAAGTGTGACGTTGACAT3'	5'-CCTAGAAGCATTTCGCGGTGCAC3'

- f. **Electroforesis de productos de PCR:** Se preparará geles de agarosa al 1.5% para la electroforesis de los productos de PCR; en cada pozo se cargó 20µl de producto de PCR para CD32 y M-CSFR; y 15ul de muestra de productos de PCR para el gen de referencia beta actina. Para determinar el peso molecular se utilizó el marcador 100bp Opti-DNA Marker, según el volumen indicado en el inserto. La corrida se realizó a 120V durante 40 minutos utilizando buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X. Las bandas fueron reveladas en el transiluminador (luz UV).

**Materiales:**

*Material biológico:* El material biológico empleado fue murinos (ratones), provenientes del Bioterio de la Universidad Católica de Santa María-Arequipa.

*Material de laboratorio:*

- Micropipetas
- Vaso de precipitado
- Tubos falcon estériles de 15 mL
- Tips estériles para micropipetas
- Jeringas 1,5,10ml
- Tubos eppendorf
- Alcohol
- Algodón
- Papel aluminio
- Hielo
- Suero fisiológico
- Equipo de disección
- Cultivo celular (placa de 06 pozos)
- Antibiótico

*Reactivos:*

- Etanol al 75%
- Agarosa
- Buffer TAE 1X 2%
- Primers CD32, M-CSFR y beta actina
- Factor estimulante de colonias granulocito (Filgrastim)
- Medio DMEN completo

*Kits:*

- OneScript® cDNA synthesis kit
- kit 2X PCR Taq Plus MasterMix
- SYBR®Safe DNA gel stain (Invitrogen)
- Kit de extracción de RNA

*Equipos:*

- Termociclador (MultiGene Optimax)
- Cámara de electroforesis
- Congeladora
- Fluorómetro
- Vórtex (Vortex Mixer eurolab)
- Mini spin
- Campana de flujo laminar
- NanoPhotometer (Implen)
- Microscopio invertido de Fluorescencia ZOE, BioRad.
- Micro Centrífuga
- Transiluminador

*Otros:*

- Papel bond A4
- Materiales de escritorio
- Computadora
- Impresora
- Fichas de recolección de datos
- Software: Microsoft Office y estadístico

## **2. Campo de verificación**

**2.1. Ubicación espacial:** El presente trabajo se realizó en las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María – Arequipa.

**2.2. Ubicación temporal:** La ejecución del proyecto se realizó a finales de febrero y primera semana de marzo del presente año.

**2.3. Unidades de estudio:** Ratones obtenidos del Bioterio de la Universidad Católica de Santa María.

**Población:** Se tomaron como población 12 ratones, de los cuales cinco formaron parte del estudio in vivo y siete formaron parte del estudio in vitro. Hubo murinos que recibieron el fármaco filgrastim y otros fueron controles. Todo ello se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María.

**Muestra:** En el presente estudio no se calculó tamaño muestral, debido a que es un trabajo experimental, además que se abarcó a todos los integrantes de la población que cumplieron los criterios de inclusión.

#### **2.4. Criterios de selección:**

***Criterios de inclusión:***

- Murinos sanos
- Macrófagos provenientes de tejido pulmonar de murinos y lavado pleural.
- Murinos con peso entre 40 a 50 gramos
- Murinos comprados del Bioterio de la Universidad Católica de Santa María

***Criterios de exclusión:***

- Murinos con alguna enfermedad
- Macrófagos provenientes de otros órganos o lugares diferentes a los mencionados anteriormente
- Murinos con pesos menores a 40 gramos o mayores a 50 gramos
- Murinos comprados de proveedores comerciales sin licencia

### 3. Estrategia de Recolección de datos

#### 3.1. Organización

- Aprobación del proyecto de tesis por médico asesor y médico dictaminador asignado por la Facultad de Medicina de la UCSM, para poder continuar con la ejecución del proyecto.
- Se coordinó con la Universidad Católica de Santa María para la compra de los animales de laboratorio (ratones) y permiso para poder llevar a cabo el trabajo en el Bioterio y Laboratorio de la universidad.
- Se solicitó permiso al comité de ética para poder trabajar con animales de laboratorio (ratones).
- Se realizó la compra del material necesario (primers, medicamentos, kit cDNA, kit PCR y otros) para la ejecución del proyecto en el laboratorio.
- Se realizó estudios piloto antes de la ejecución del proyecto con murinos en el laboratorio de la universidad.
- Se realizó la ejecución del proyecto mediante la administración del medicamento filgrastim vía subcutánea, luego la extracción de tejido pulmonar, para luego realizar la transcripción inversa acoplada y amplificación por PCR (RT-PCR) para los genes de CD32, M-CSFR, beta actina y la electroforesis respectiva en el laboratorio.
- Organización de los datos obtenidos en laboratorio y procesamiento de datos en hojas de cálculo para su posterior análisis estadístico e interpretación.

#### 3.2. Recursos

- Humanos: Investigadora: Yulisa Lope Choque  
Asesor: Dr. Jesús Salinas Gamero  
Personal especialista en laboratorio y en el Bioterio
- Financieros: El dinero proviene del Concurso ganado en la Jornada Santamariana 2018 y de la investigadora

### 3.3. Criterios para manejo de resultados

a) Plan de Procesamiento:

Los datos serán obtenidos a partir de los resultados obtenidos en el laboratorio, los cuales serán codificados y tabulados.

b) Plan de Clasificación:

Se clasificarán los datos en el programa Microsoft Excel 2016 para la adecuada organización de la información.

c) Plan de Conteo:

Dado que los datos se encontrarán ingresados en un sistema electrónico, el conteo se llevará a cabo mediante funciones predeterminadas en las hojas de cálculo de Microsoft Excel 2016 y el programa estadístico SPSS v11.

d) Plan de Análisis:

La estadística descriptiva se realizará por medio de frecuencias y porcentajes (medias y desviaciones estándar para las variables numéricas). Los datos fueron analizados mediante una prueba no paramétrica (Prueba de Friedman). Se tomó como significativo un valor de  $p < 0,05$  y un intervalo de confianza del 95%.



## **CAPITULO II**

### **RESULTADOS**

## Efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 Y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020

### Gráfico N°1

#### Cultivo celular de lavado pleural murino



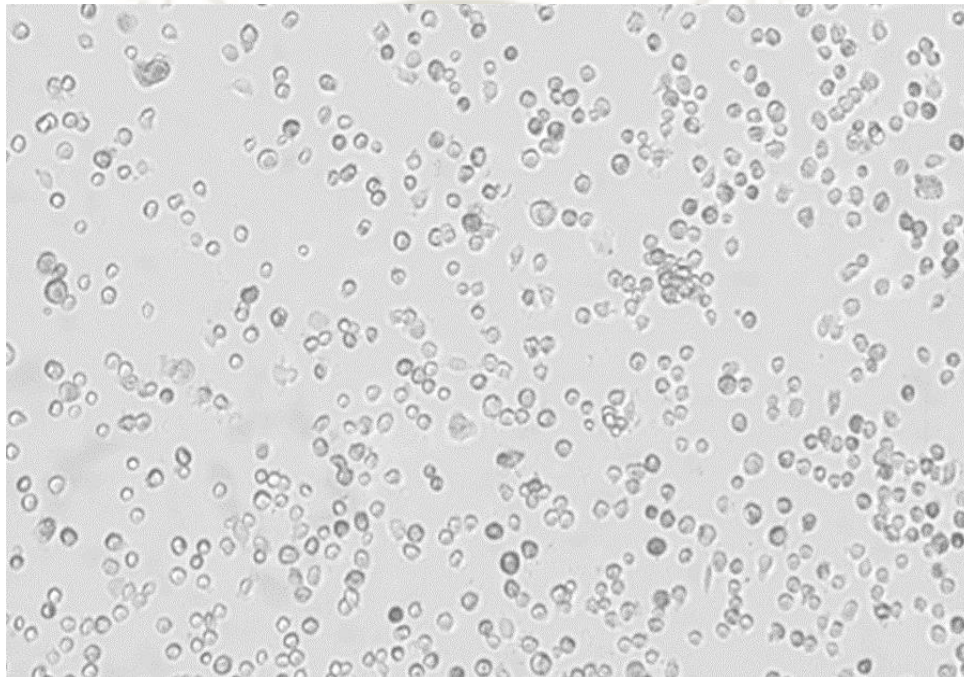
Fuente: Foto tomada mediante el microscopio invertido de Fluorescencia ZOE, BioRad.

En el grafico N°1 podemos ver el cultivo celular inicial del lavado pleural cultivado en placas de seis pozos, previo a la administración del medicamento filgrastim, visualizado mediante el microscopio invertido de Fluorescencia ZOE, BioRad a un aumento de 100X. Con una confluencia del 60%.

## Efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 Y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020

Gráfico N°2

### Cultivo celular de lavado broncoalveolar murino



Fuente: Imagen tomada de Nayak, D.K., Mendez, O., Bowen, S., Mohanakumar, T. Isolation and In Vitro Culture of Murine and Human Alveolar Macrophages. *J. Vis. Exp.* (134), e57287, doi:10.3791/57287 (2018) (47).

En el grafico N°2 vemos una imagen referencial del cultivo celular de lavado broncoalveolar de un murino al séptimo día de cultivo celular. A una escala de 400um, con una confluencia del 80%.

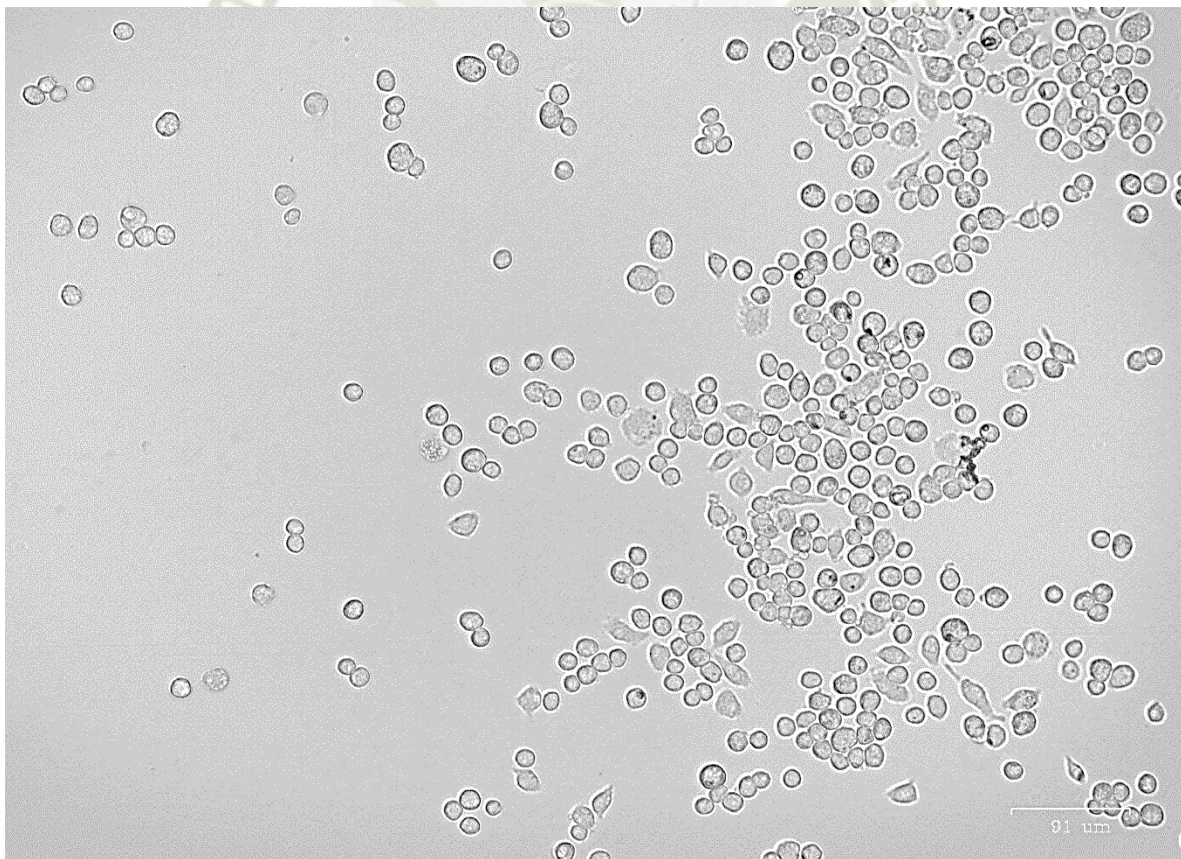
Antes de la administración de filgrastim en los pozos de las placas del cultivo celular proveniente del líquido pleural de los murinos había una confluencia celular del 60%, luego de 48 horas de administrado el fármaco se obtuvo una confluencia del 80-85%, a predominio

de células con un diámetro entre 10 a 15 $\mu$ m, lo cual nos indicaría que el fármaco como factor estimulante de colonias granulocito (FEC-G) ocasionó la proliferación de granulocitos (neutrófilos en especial), debido a su mecanismo de acción sobre granulocito.

### **Efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 Y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020**

**Gráfico N°3a**

**Viabilidad celular del lavado pleural en murino**

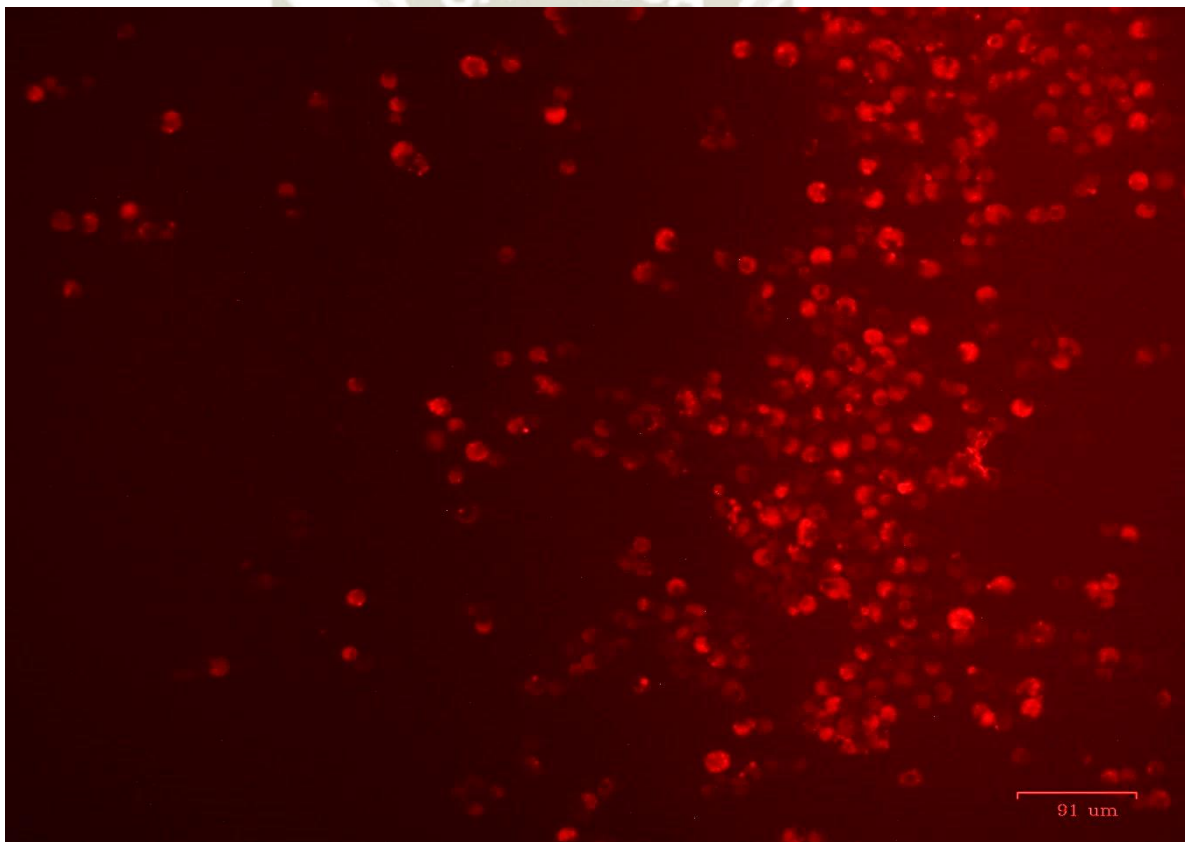


Fuente: Foto tomada mediante el microscopio invertido de Fluorescencia ZOE, BioRad.

## Efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 Y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020

Gráfico N°3B

Viabilidad celular del lavado pleural en murino



Fuente: Foto tomada mediante el microscopio invertido de Fluorescencia ZOE, BioRad.

La viabilidad celular fue de un 88,67%. En el grafico 3a se contaron 53 células en total y el grafico 3b se contaron 47 células que emitían un color rojo fluorescente visualizado mediante el microscopio invertido de Fluorescencia ZOE, BioRad. Lo cual indica que la viabilidad celular base con la que empezamos nuestro estudio era buena.

## Efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 Y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020

Tabla N°1

Relación entre la expresión de actina, CD32 y M-CSFR para ratón control

### Estadísticos descriptivos

	N	Percentiles		
		25	50 (Mediana)	75
ACTINA	2	120,7500	161,5000	121,5000
CD32	2	247,5000	332,5000	251,2500
M-CSFR	2	1875,0000	2501,5000	1877,2500

Fuente: Elaboración personal

### Estadísticos de prueba<sup>a</sup>

N	2
Chi-cuadrado	4,000
gl	2
Sig. asintótica	0,135

a. Prueba de Friedman

En los dos murinos control utilizados para este estudio, se evaluó la relación entre la expresión de ADN (ácido desoxirribonucleico) para actina, CD32 y M-CSFR; obteniéndose un valor  $p = 0.135$ , que es mayor al 0.05 esperado de un intervalo de confianza del 95%. Por lo tanto, no existe diferencia entre el nivel de expresión de actina, CD32 o M-CSFR.

## Efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 Y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020

Tabla N°2

Relación entre la expresión de actina, CD32 y M-CSFR para tejido pulmonar

Estadísticos descriptivos				
	N	Percentiles		
		25	50 (Mediana)	75
ACTINA	2	239,2500	542,0000	573,7500
CD32	2	250,5000	862,0000	1042,5000
M-CSFR	2	984,0000	1439,0000	1174,5000

Fuente: Elaboración personal

Estadísticos de prueba <sup>a</sup>	
N	2
Chi-cuadrado	1,000
gl	2
Sig. asintótica	0,607

a. Prueba de Friedman

Los dos ratones a quienes se les administró el medicamento filgrastim por vía subcutánea a una dosis de 300ng/día diluido en 1.5ul de suero fisiológico, se evaluó la relación entre la expresión de ADN para actina, CD32 y M-CSFR; obteniéndose un valor  $p = 0.607$ , valor mayor al 0.05 esperado de un intervalo de confianza del 95%. Por lo tanto, no existe diferencia entre el nivel de expresión para dichos genes.

**Efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 Y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020**

**Tabla N°3**

**Relación entre la expresión de actina, CD32 y M-CSFR para lavado pleural**

**Estadísticos descriptivos**

	N	Percentiles		
		25	50 (Mediana)	75
ACTINA	2	1638,0000	2253,0000	1741,5000
CD32	2	173,2500	313,5000	297,0000
M-CSFR	2	1382,2500	2138,0000	1824,7500

Fuente: Elaboración personal

**Estadísticos de prueba<sup>a</sup>**

N	2
Chi-cuadrado	3,000
gl	2
Sig. asintótica	0,223

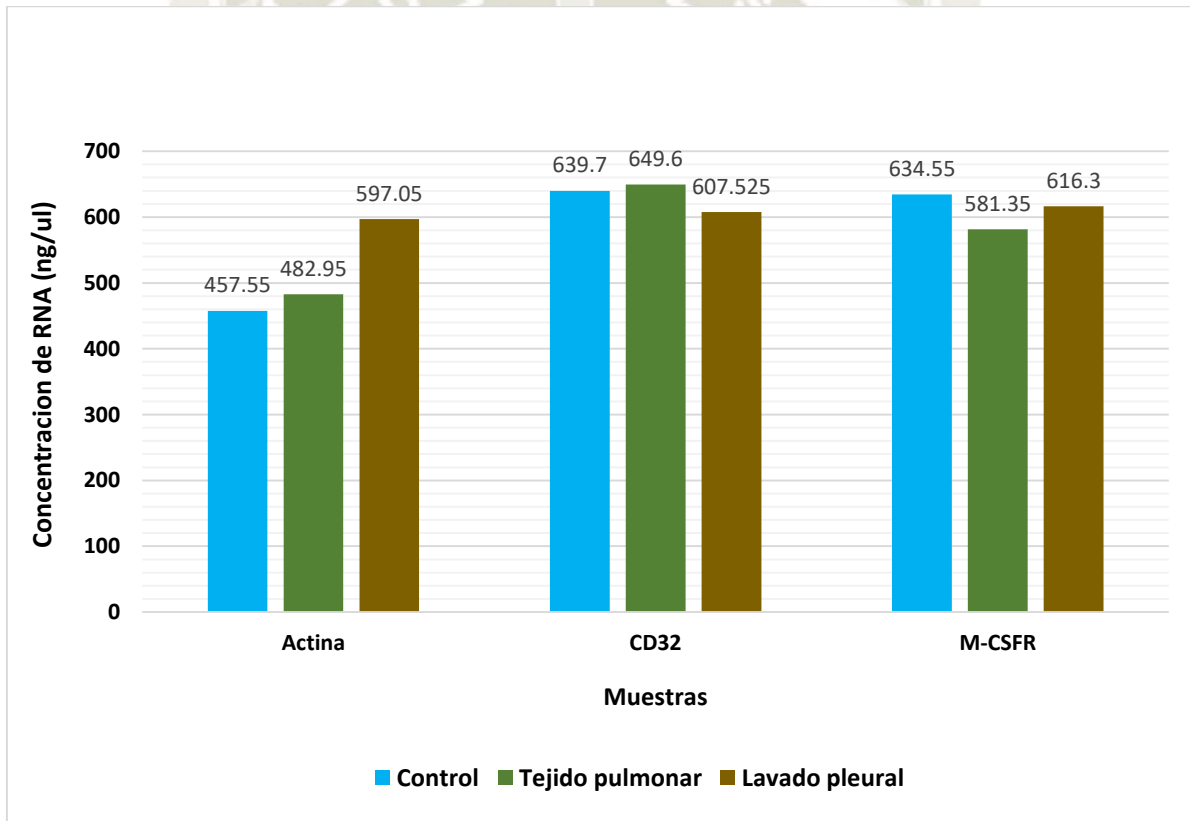
a. Prueba de Friedman

La expresión de ADN para actina, CD32 y M-CSFR de ratones a quienes se les realizó el lavado pleural con 2ml de suero fisiológico, y luego el cultivo celular con 100ng/ml de filgrastim por 48 horas, no demostró diferencia significativa en la expresión de dichos genes, con un valor de  $p=0.223$  ( $p>0.05$ ).

## Efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 Y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020

Grafico N°4

### Concentración de RNA en murinos



Fuente: Elaboración personal

**Efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 Y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020**

**Tabla N°4**

**Concentración de RNA en murinos**

<b>Gen</b>	<b>Control</b>	<b>Tejido pulmonar</b>	<b>Lavado pleural</b>
<b>Actina</b>	457.55	482.95	597.05
<b>CD32</b>	639.7	649.6	607.525
<b>M-CSFR</b>	634.55	581.35	616.3

Fuente: Elaboración personal

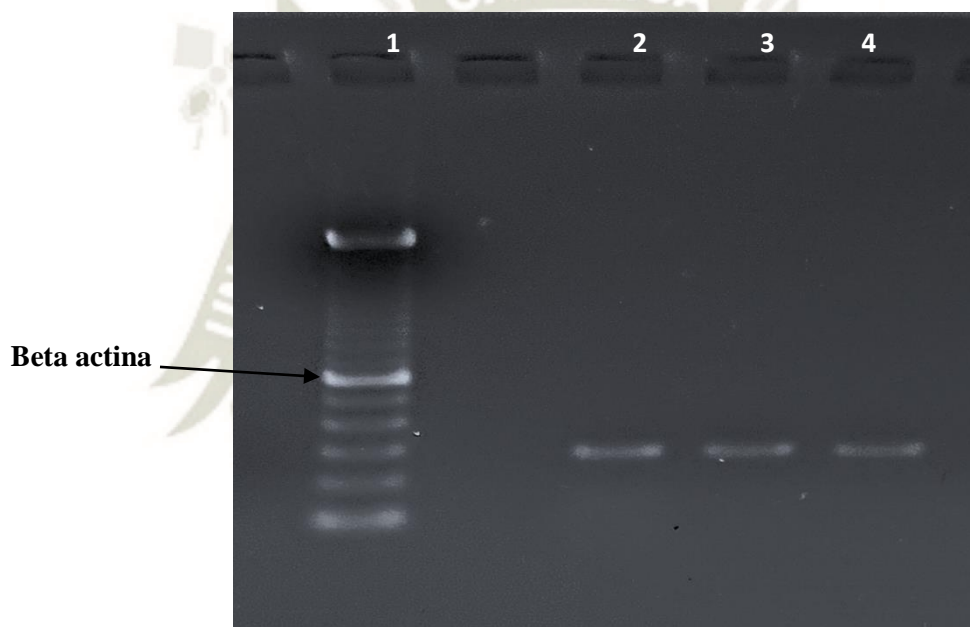
P=1 (p>0.05)

Los valores de la concentración de RNA posterior a la reacción en cadena de la polimerasa, según la prueba no paramétrica (Prueba de Friedman), se obtiene un valor de p=1, valor mayora p>0.05, con un intervalo de confianza del 95%, ese valor indica que no hubo diferencia significativa entre las concentraciones de RNA de las muestras procesadas.

## Efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 Y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020

Gráfico N°5

Expresión de beta actina en tejido pulmonar de murinos



Fuente: Elaboración personal

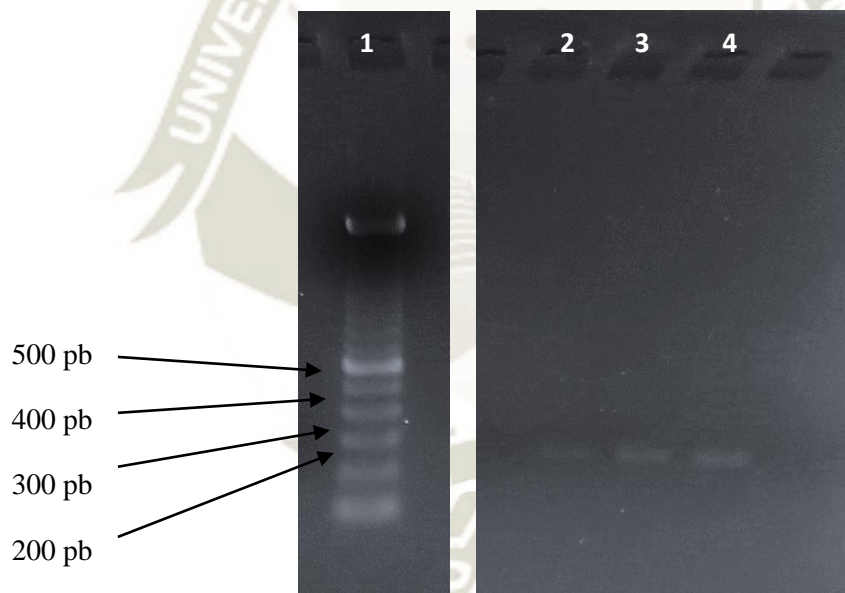
En el gráfico N°4 se observa la corrida electroforética de las muestras de PCR (reacción de cadena de la polimerasa) de tejido pulmonar, donde se muestra bandas en el número 2,3 y 4. Lo cual demuestra la integridad del RNA extraído. El número 2 corresponde a PCR de tejido pulmonar de murino control, 3 y 4 son muestras de PCR de tejido pulmonar de murinos tratados con filgrastim.

Normalmente el fragmento amplificado de actina tiene un peso molecular de 286 pares de bases, y al ser la única banda identificada en la imagen de cada carril, ello corresponde a actina.

**Efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 Y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020**

**Gráfico N°6**

**Expresión de beta actina en lavado pleural de murinos**



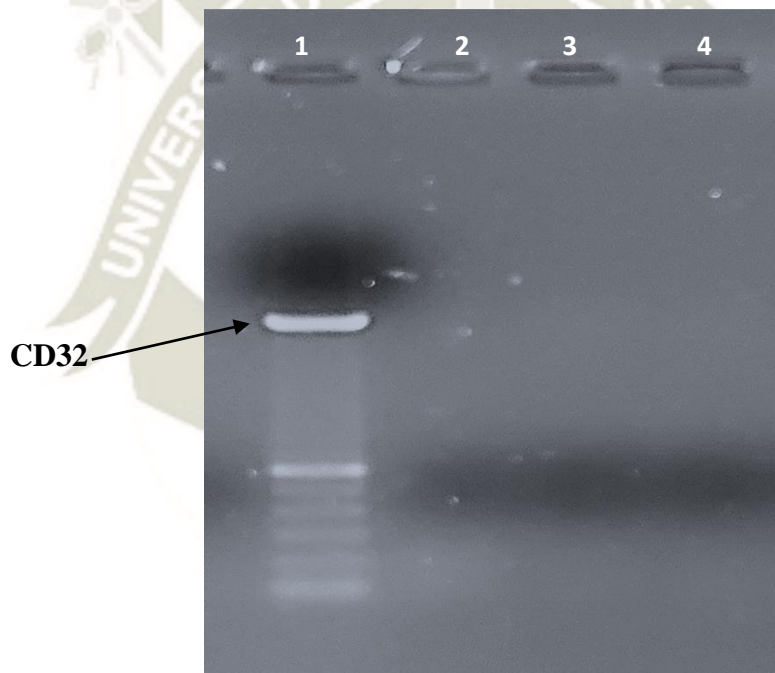
Fuente: Elaboración personal

En el gráfico N°5 se observan bandas en el número 2,3 y 4 que corresponden al fragmento amplificado de actina con un peso molecular de 286 pares de bases. Lo cual demuestra la integridad del RNA extraído. Los números 2, 3 y 4 son muestras de PCR para actina de lavado pleural de murinos tratados con filgrastim in vitro.

## Efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 Y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020

Gráfico N°7

### Expresión de CD32 en tejido pulmonar de murinos



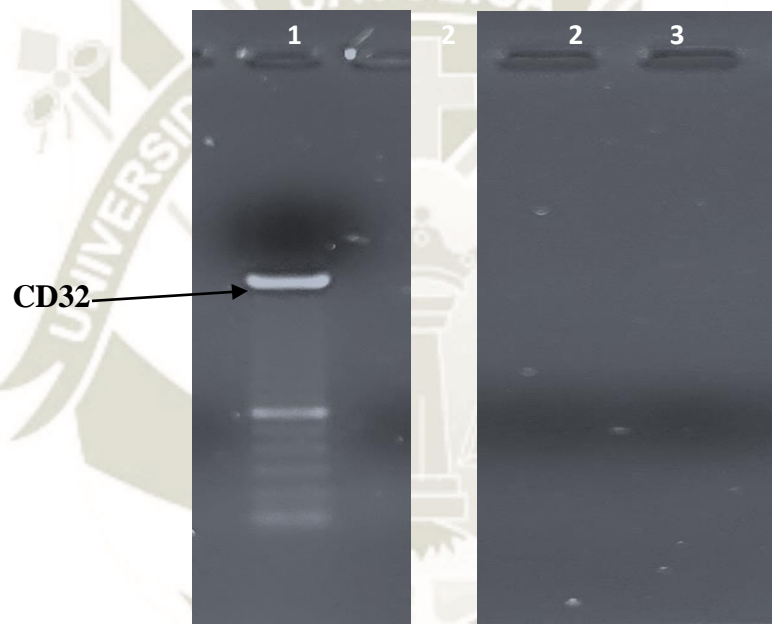
Fuente: Elaboración personal

En el gráfico N°6 se evalúa la expresión de CD32, sin embargo, se observa que no se forma ninguna banda en los carriles correspondientes al tejido pulmonar de los ratones tratados y del control. Así mismo, el fragmento amplificado de CD32 tiene un peso molecular de 523 pares de bases, y en la imagen si se forman las bandas correspondientes al marcador. El número 1 corresponde al marcador, el número 2 y 3 corresponde a PCR de tejido pulmonar de murino control, 3 y 4 son muestras de PCR de tejido pulmonar de murinos tratados con filgrastim.

## Efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 Y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020

Gráfico N°8

Expresión de CD32 en lavado pleural de murinos



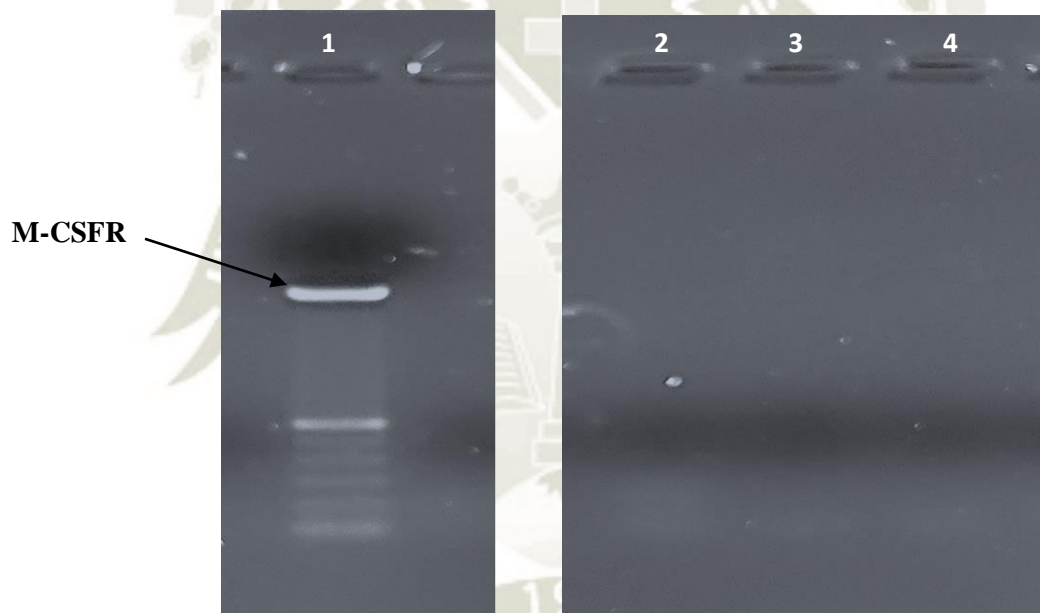
Fuente: Elaboración personal

En el gráfico N°7 se evalúa la expresión de CD32 en el lavado pleural en ratones, y se observa que se forman bandas electroforéticas de acuerdo al peso molecular en el marcador, sin embargo, no se evidencia ninguna banda en los carriles correspondientes al lavado pleural de los ratones tratados in vitro. El número 1 corresponde al marcador, el número 2 y 3 corresponde a la PCR de lavado pleural de murinos tratados in vitro con filgrastim.

## Efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 Y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020

Gráfico N°9

Expresión de M-CSFR en tejido pulmonar de murinos



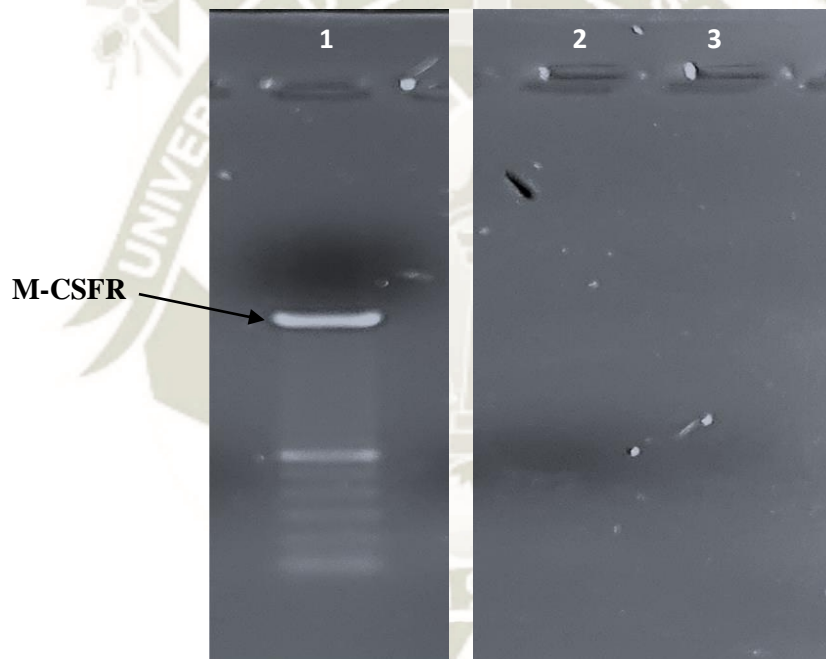
Fuente: Elaboración personal

En el gráfico N°8 se observa la corrida electroforética donde se evalúa la expresión de M-CSFR, y no se evidencia ninguna banda electroforética en los carriles correspondientes al tejido pulmonar de los ratones tratados y del control. El fragmento amplificado de M-CSFR tiene un peso molecular de 444 pares de bases, y en la imagen si se forman las bandas correspondientes al marcador. El número 1 corresponde al marcador, el numero 2 corresponde a PCR de tejido pulmonar de murino control, 3 y 4 son muestras de PCR de tejido pulmonar de murinos tratados con filgrastim.

## Efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 Y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020

Gráfico N°10

Expresión de M-CSFR en lavado pleural de murinos



Fuente: Elaboración personal

En el gráfico N°9 se evalúa la expresión de M-CSFR en el lavado pleural de murinos, no obstante, tampoco se visualizan las bandas correspondientes a M-CSFR en los carriles de los ratones con tratamiento in vitro con filgrastim.

El número 1 corresponde al marcador, el número 2 y 3 corresponde a la PCR de lavado pleural de murino tratados in vitro con filgrastim.



**CAPITULO III**

**DISCUSIÓN Y COMENTARIOS**

## DISCUSIÓN

Tras la búsqueda de antecedentes investigativos en cuanto al uso del fármaco factor estimulante de colonias granulocito recombinante humano (filgrastim) como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar, no se ha encontrado artículos científicos a nivel mundial y local publicados respecto a ello, sin embargo, hay experiencia local de cuatro casos de proteinosis alveolar pulmonar (PAP) en Arequipa en los últimos cinco años los cuales fueron tratados con filgrastim mediante nebulizaciones con suero fisiológico y se obtuvo resultados favorables, 01 paciente fue tratado con este fármaco acompañado del lavado pulmonar completo y 03 pacientes fueron tratados solamente con el fármaco.

La PAP es una enfermedad muy rara a nivel mundial y local, con una prevalencia de 4.44 y una incidencia de 0.56 en Korea, según un estudio realizado entre 2010 a 2016 (40), hasta 7 casos por millón de personas en Estados Unidos y Japón (32). El tratamiento mediante lavado pulmonar completo (LPC) se realiza desde los años sesenta, y la administración del factor estimulante de colonias granulocito macrófagos se realiza desde que se empezó a conocer más sobre la fisiopatología de esta enfermedad, a mediados de los años noventa, se administró por vía subcutánea y se observó una marcada mejoría de los síntomas y la oxigenación arterial. Con el paso de los años se empezaron a usar nuevos fármacos dentro de ellos están el rituximab y las estatinas, pero uso está aún en estudio (32).

El factor estimulante de las colonias granulocito macrófago recombinante (sargramostim) es producido por ingeniería genética, la experiencia con este fármaco por inhalación o inyección subcutánea está aumentando, sin embargo, no se usa como tratamiento de primera línea para la PAP, debido a que la tasa de respuesta de pacientes tratados con sargramostim es menor al tratamiento con lavado pulmonar completo (1). Por ello, sargramostim es reservado para pacientes que no pueden someterse al lavado pulmonar completo o que no ha funcionado el procedimiento (33). Sargramostim viene en una ampolla que necesita ser refrigerado a temperaturas de 2 a 8°C, una vez abierto la ampolla se puede usar dentro de las seis horas

siguientes y como este fármaco no lo venden en nuestro país, no podría usarse en pacientes con PAP que no respondan al LPC (41).

En este trabajo se administró el medicamento por vía subcutánea a los murinos in vivo y también a los cultivos celulares in vitro; el procedimiento que se usó para obtener macrófagos pulmonares pudo haber influido en los resultados obtenidos, porque Deepak et al. establece un protocolo para la extracción de macrófagos alveolares en murinos, en el cual realizan un lavado broncoalveolar mediante una incisión en la tráquea colocando una sonda de calibre 22 o mediante el corte del tejido pulmonar en trozos muy pequeños en una placa (42), en nuestro estudio para la extracción de macrófagos pulmonares se tomó un trozo del tejido pulmonar, se realizó la eutanasia previa del murino mediante dislocación cervical, luego se realizó la disección desde el abdomen hasta llegar a la cavidad torácica, y se tomó un trozo de tejido pulmonar el cual se cortó en trozos muy pequeños en un tubo de 1.5ml conteniendo trizol para realizar la extracción de RNA; además se realizó el lavado pleural mediante la inyección a través del diafragma, previa disección de la cavidad abdominal para tener una mejor visualización con 1ml de cloruro de sodio al 9% en dos oportunidades, se movió al murino de lado a lado y luego se aspiró mediante la jeringa obteniéndose un líquido transparente. En pacientes sanos las células presentes en el lavado broncoalveolar son: macrófagos 96%, linfocitos 3% y polimorfonucleares 1% (25), datos que indican que en pulmones las células que predominan son los macrófagos.

La dosis utilizada de filgrastim en este estudio fue de 300ng/día, que equivale a 6ug/kg/día, sin embargo, en un estudio realizado por Scholz et al. en murinos sanos se les administró filgrastim a una dosis mucho mayor ( $3 \times 10 \mu\text{g}$  y  $3 \times 20 \mu\text{g}$ ) en días consecutivos con la finalidad de construir un modelo farmacocinético (50,51), por vía subcutánea al igual que en nuestro estudio, y no mencionaron efectos adversos del fármaco a tales dosis, debido a que se considera seguro incluso a dosis mayores a las utilizadas en dicho estudio (34).

Al evaluar las ventajas de filgrastim respecto a sargramostim, podemos mencionar que: Primero: El fármaco está disponible para la venta en nuestro país y lo proporcionan los hospitales públicos de manera gratuita para patologías oncológicas a diferencia de sargramostim cuya venta es restringida. Segundo: Su costo es menor respecto a sargramostim. Tercero: Filgrastim puede ser usado en pacientes embarazadas, se recomienda

la dosis efectiva más baja para poder mantener un recuento absoluto de neutrófilos, sargramostim no se recomienda su uso durante el embarazo porque en algunas formas de dosificación pueden contener alcohol bencílico, el cual está asociado con el síndrome de jadeo en bebés prematuros), si es necesario su uso durante el embarazo, se recomienda la forma liofilizada sin conservantes (33,34).

El conteo celular del lavado pleural se realizó utilizando la cámara de Neubauer, donde se obtuvo un promedio de 400 000 células, la diferenciación de macrófagos de otro tipo celular se realizó mediante el tamaño de la célula y la forma del núcleo; además se evaluó la viabilidad celular mediante el reactivo de viabilidad celular alamarBlue, en nuestro estudio de obtuvo una viabilidad de 88,7%, como un control de calidad, valor que indica que dichas células estaban en el momento óptimo para el desarrollo de sustitutos biológicos (43, 44).

La extracción de RNA se realizó mediante el protocolo TRI Reagent® Protocol (45), al final se agregó 25ul de agua DEPC (Dietilpirocarbonato) en el tubo de 1.5ml donde estaba el pellet de RNA, considerado útil cuando se va a trabajar con RNA, porque es una sustancia química que elimina las ribonucleasas, enzimas capaces de degradar el RNA (46), enzimas encargadas de la hidrólisis del RNA en componentes más pequeños.

Tracey et al., realizó un estudio en pacientes con PAP y ratones “knockout” para FEC-GM; donde se demostró que en la PAP había una deficiencia del FEC-GM, y que la expresión de RNAm (ácido ribonucleico mensajero) en los macrófagos alveolares provenientes de pacientes con PAP está marcadamente disminuido en comparación a pacientes sanos. Además, los marcadores de diferenciación terminal CD32, receptor de manosa y M-CSFR dependientes de PU.1 estaban disminuidos en esta patología (25).

En nuestro estudio se utilizaron a CD32 y M-CSFR como marcadores de macrófagos, y beta actina “Housekeeping gene” como punto de referencia para el análisis de los niveles de expresión de otros genes. En los gráficos N°4 y 5, se muestra la expresión de beta actina en la corrida electroforética de las muestras de murinos que fueron tratados con el fármaco en el estudio in vivo e in vitro y también en el murino control, lo cual indica la integridad del RNA extraído. No obstante, la expresión de CD32 y M-CSFR no se expresaron en los murinos con o sin tratamiento (ver gráficos N°6-9).

CD32 (FcyRII) considerada parte del grupo de receptores para la inmunoglobulina G (IgG), se encuentra en la superficie celular de macrófagos, granulocitos y linfocitos; cuya función es atenuar la inflamación, mediante la retroalimentación de linfocitos B (47). Los macrófagos son células presentadoras de antígenos que se encuentran en todos los tejidos, dentro de ellos los pulmones; presenta diferentes tipos de marcadores, tales como: Receptor manosil fucosil, receptores para la porción Fc de la IgG (FcyRI: de alta afinidad o CD64, FcyRII: de afinidad media o CD32 y FcyRIII: de baja afinidad o CD16), CD14 y receptores para citocinas (48).

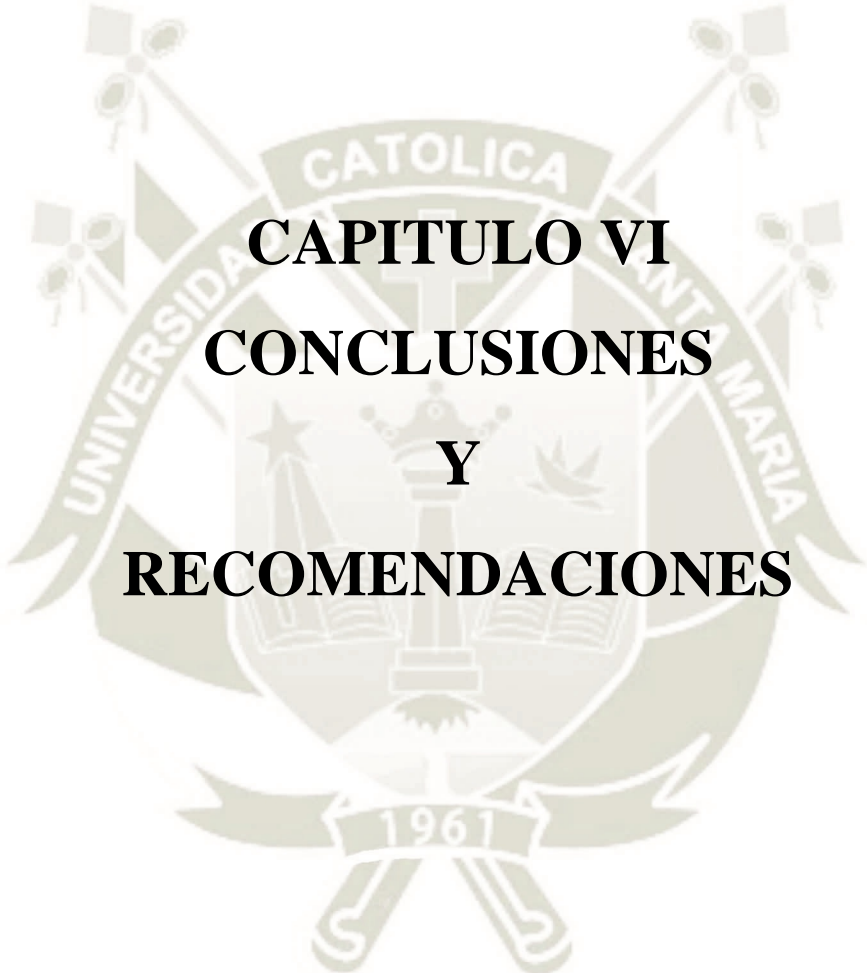
En el gráfico N°7 y 8 no se evidencia bandas electroforéticas correspondientes a CD32 en tejido pulmonar y lavado pleural, a pesar de haber obtenido los primers de artículos científicos, además que en murinos la familia de receptores Fc para IgG incluye cuatro miembros FcyRI, IIB, III y IV, esto quiere decir que CD32 bajo la forma de FcyRIIB se expresa en murinos (49).

Reconocemos como limitación de este trabajo el uso de murinos sanos en lugar de murinos enfermos con PAP, como el que se llevó a cabo en el estudio de Bonfield et al (25), en el que usó ratones “knockout”, sin embargo, este tipo de ratones requieren de mucho cuidado además son caros. Así mismo, la administración del medicamento filgrastim a los murinos por vía subcutánea en lugar de la administración inhalatoria, la forma como se administró el fármaco en la experiencia local, y el tiempo de administración pudo haber influido en los resultados obtenidos en este trabajo debido a que la terapia con FEC-GM inhalado, como ruta de tratamiento local, lograría una mejor eficacia con menos efectos secundarios (6).

La principal fortaleza de este trabajo radica en ser un estudio prospectivo y experimental, además que no hay reportes en artículos científicos a nivel local y mundial del uso de este fármaco como tratamiento en pacientes con PAP. Además, considerar este trabajo como precedente para la realización de nuevos proyectos de investigación mediante el uso de este fármaco como alternativa terapéutica a sargramostim.

A pesar que en este trabajo de investigación se obtuvieron resultados en los cuales no hubo diferencia significativa en la expresión de CD32 y M-CSFR en macrófagos murinos, esto fue probablemente porque: Primero: El medicamento se administró por vía subcutánea en lugar de la vía inhalatoria. Segundo: Filgrastim se administró por un periodo muy corto. Tercero: No se usó ratones enfermos (ratones “knockout”).





**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES**  
**Y**  
**RECOMENDACIONES**

## CONCLUSIONES

**Primera:** El filgrastim no tuvo efecto en la expresión de CD32 y M-CSFR en el tejido pulmonar de murinos tratados con el fármaco en el estudio electroforético, manifestándose con la ausencia de banda electroforética a la altura del peso molecular correspondiente al marcador.

**Segunda:** El filgrastim no tuvo efecto en la expresión de CD32 y M-CSFR en el lavado pleural realizado a murinos con tratamiento in vitro en el estudio electroforético, manifestándose con la ausencia de banda electroforética a la altura del peso molecular correspondiente al marcador.

**Tercera:** No existe diferencia significativa entre el nivel de expresión de actina, CD32 o M-CSFR. en los murinos control utilizados para este estudio, valor de  $p = 0.135(p>0.05)$  para un intervalo de confianza del 95%.

**Cuarta:** No existe diferencia significativa entre el nivel de expresión de actina, CD32 o M-CSFR. en los murinos a quienes se les administró el medicamento filgrastim por vía subcutánea, valor de  $p = 0.0.607 (p>0.05)$  para un intervalo de confianza del 95%.

**Quinta:** No existe diferencia significativa entre el nivel de expresión de actina, CD32 o M-CSFR. en ratones a quienes se les realizó el lavado pleural con 2ml de suero fisiológico y administración de filgrastim in vitro, valor de  $p=0.223 (p>0.05)$  para un intervalo de confianza del 95%.

**Sexta:** La concentración de RNA obtenida para la reacción en cadena de la polimerasa no tuvo diferencia significativa entre el control, tejido pulmonar y lavado pleural.

## RECOMENDACIONES

**Primera:** Se recomienda a la Universidad Católica de Santa María la implementación y equipamiento de los laboratorios, para poder realizar estudios experimentales a futuro, como por ejemplo con ratones “knockout” o trabajar con líneas celulares específicas.

**Segunda:** Se recomienda realizar estudios experimentales a futuro con ratones enfermos de proteinosis alveolar pulmonar (por ejemplo: ratones “knockout”). Además, administrar el medicamento por un periodo más prolongado (entre 2 a 4 semanas) a una dosis mayor y que el medicamento se administre por vía inhalatoria.

**Tercera:** Se recomienda a los médicos generales, residentes y especialistas reportar los casos de patologías poco comunes, como la proteinosis alveolar pulmonar, para obtener información real acerca de la prevalencia e incidencia de esta enfermedad.

**Cuarta:** Se recomienda a los médicos generales, residentes y especialistas, realizar un adecuado diagnóstico en pacientes en los cuales el diagnóstico es incierto, porque se podría tratar de un caso de proteinosis alveolar pulmonar, patología que es confundida en adultos con neumonía y en niños con asma.

**Quinta:** Se recomienda a los médicos neumólogos, residentes de la especialidad y estudiantes de medicina en general realizar estudios prospectivos sobre el uso de filgrastim como alternativa terapéutica al sargramostim en pacientes con proteinosis alveolar pulmonar,

**Sexta:** Se recomienda realizar un estudio comparativo a nivel experimental entre filgrastim y sargramostim como alternativa terapéutica en pacientes con PAP o en animales de laboratorio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Takuji Suzuki, T, Bruce C. Trapnell, B. Pulmonary alveolar proteinosis Syndrome. *Clinics in Chest Medicine*. 2016; 37(3): 431-440.
2. Carey B, Trapnell BC. The molecular basis of pulmonary alveolar proteinosis. *Clin Immunol*. 2010;135(2):223-235.
3. Inoue, Y., Trapnell, B. C., Tazawa, R., Arai, T., Takada, T., Hizawa, N., ... Japanese Center of the Rare Lung Diseases Consortium (2008). Characteristics of a large cohort of patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis in Japan. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 177(7), 752–762. doi:10.1164/rccm.200708-1271OC
4. Patel SM, Sekiguchi H, Reynolds JP, Krowka MJ. Pulmonary alveolar proteinosis. *Can Respir J*. 2012;19(4):243-245.
5. Juvet SC, Hwang D, Waddell TK, Downey GP. Rare lung disease II: Pulmonary alveolar proteinosis. *Can Respir J*. 2008;15(4):203-210.
6. Sheng G, Chen P, Wei Y, Chu J, Cao X, Zhang HL. Better approach for autoimmune pulmonary alveolar proteinosis treatment: inhaled or subcutaneous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: a meta analyses. *Respir Res*. 2018;19(1):163.
7. Seymour JF, Presneill JJ. Pulmonary alveolar proteinosis: progress in the first 44 years. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166(2):215-35.
8. Xu Z, Jing J, Wang H, Xu F, Wang J. Pulmonary alveolar proteinosis in China: a systematic review of 241 cases. *Respirology*. 2009; 14(5):761-766.
9. Inoue Y, Trapnell BC, Tazawa R, et al. Characteristics of a Large Cohort of Patients with Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis in Japan. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2008; 177(7):752-762.
10. Presneill JJ, Nakata K, Inoue Y, Seymour JF. Pulmonary alveolar proteinosis. *Clin Chest Med*. 2004; 25(3):593-613
11. Bonella Francesco, F, Peter C. Bauer, P, et al. Pulmonary alveolar proteinosis: New insights from a single-center cohort of 70 patients, *Respiratory Medicine*. 2011, 105(12): 1908-1916

12. Suzuki T, Sakagami T, Young LR, et al. Hereditary Pulmonary Alveolar Proteinosis: Pathogenesis, Presentation, Diagnosis, and Therapy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2010; 182(10):1292-1304.
13. Campo I, Mariani F, Rodi G, et al. Assessment and management of pulmonary alveolar proteinosis in a reference center. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2013; 40(8).
14. Beccaria M, Luisetti M, et al. Long-term durable benefit after whole lung lavage in pulmonary alveolar proteinosis. *European Respiratory Journal* 2004 23: 526-531
15. Turkistany, S.A., DeKoter, R.P. The Transcription Factor PU.1 is a Critical Regulator of Cellular Communication in the Immune System. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 59, 431–440 (2011) doi:10.1007/s00005-011-0147-9
16. Xu Z, Jing J, Wang H, Xu F, Wang J. Pulmonary alveolar proteinosis in China: a systematic review of 241 cases. *Respirology*. 2009; 14(5):761-756.
17. Seymour JF, Dunn AR, Vincent JM, Presneill JJ, Pain MC. Efficacy of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in acquired alveolar proteinosis. *N Engl J Med*. 1996; 335(25):1924-1925.
18. Tazawa R, Hamano E, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and lung immunity in pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171(10):1142-1149.
19. Tazawa R, Hamano E, Arai T, et al. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Lung Immunity in Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171 (10): 1142-1149.
20. James E. Frampton, C. Rhoda Lee and Diana Faulds Filgrastim A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Efficacy in Neutropenia. 1994; 48 (5): 731.
21. Ramirez J., Kieffer R.F., Ball W.C. Bronchopulmonary lavage in man. *Ann. Intern. Med*. 1965;63(5):819–828.
22. Gajewska ME, Sritharan SS, Santoni-Rugiu E, Bendstrup EM. Autoimmune pulmonary alveolar proteinosis in an adolescent successfully treated with inhaled rhGM-CSF (molgramostim). *Respiratory Medicine Case Reports*. 2018; 23:167-169.
23. Fda, F. Leukine (sargramostim) A Recombinant GM-CSF–Yeast-Expressed. [Online]. Available from:

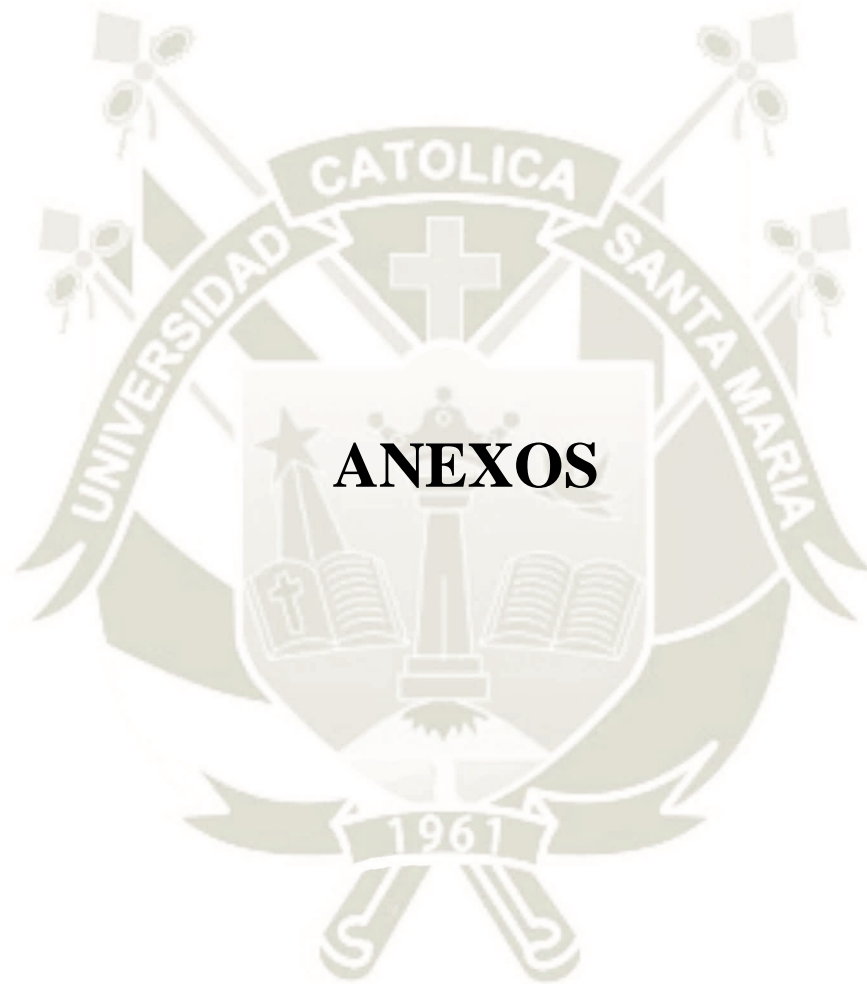
- [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/103362s52371bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/103362s52371bl.pdf)  
[Accessed 20 October 2018].
24. Fda. F. NEUPOGEN® (Filgrastim) Amgen Manufacturing, Limited, a subsidiary of Amgen Inc. [Online]. Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2012/103353s51471bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/103353s51471bl.pdf)  
[Accessed 20 October 2018].
25. Tracey L. Bonfield, Baisakhi Raychaudhuri, et al. PU.1 regulation of human alveolar macrophage differentiation requires granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *2003*; 285(5): L1132-L1136
26. Bhattacharya P, Thirupathi M, et al. GM-CSF: An Immune Modulatory Cytokine that can Suppress Autoimmunity. *Cytokine*. 2015; 75(2):261-271.
27. Tazawa R, Trapnell BC, Inoue Y, et al. Inhaled Granulocyte/Macrophage–Colony Stimulating Factor as Therapy for Pulmonary Alveolar Proteinosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2010;181(12):1345-1354.
28. Bonfield TL, Kavuru MS, and Thomassen MJ. Anti-GM-CSF titer predicts response to GM-CSF therapy in pulmonary alveolar proteinosis. *Clin Immunol* 105: 342–350, 2002.
29. Zhang, F., Weng, D., Su, Y., Yin, C., Shen, L., Zhang, Y., ... Li, H. Therapeutic effect of subcutaneous injection of low dose recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on pulmonary alveolar proteinosis. *Respiratory research*, 2020. 21(1), 1. doi:10.1186/s12931-019-1261-1
30. McCarthy, C., Lee, E., Bridges, J. P., Sallèse, A., Suzuki, T., Woods, J. C., Trapnell, B. C. Statin as a novel pharmacotherapy of pulmonary alveolar proteinosis. *Nature communications*, 2018. 9(1), 3127. doi:10.1038/s41467-018-05491-z
31. Ishii, H., Seymour, J. F., Tazawa, R., Inoue, Y., Uchida, N., Nishida, A., ... Nakata, K. Secondary pulmonary alveolar proteinosis complicating myelodysplastic syndrome results in worsening of prognosis: a retrospective cohort study in Japan. *BMC pulmonary medicine*, 2014.14, 37. doi:10.1186/1471-2466-14-37
32. Trapnell, Nakata, Bonella, Campo, Griese, Hamilton, Tisha Wang, Morgan, Cottin and Cormac McCarthy. Pulmonary alveolar proteinosis. *Nat Rev Dis Primers* 2019. 5, 16 doi:10.1038/s41572-019-0066-3

33. UpToDate. Sargramostim: Drug information.  
[https://www.uptodate.com/contents/sargramostim-drug-information?search=sargramostim&source=panel\\_search\\_result&selectedTitle=1~25&usage\\_type=panel&kp\\_tab=drug\\_general&display\\_rank=1#F220000](https://www.uptodate.com/contents/sargramostim-drug-information?search=sargramostim&source=panel_search_result&selectedTitle=1~25&usage_type=panel&kp_tab=drug_general&display_rank=1#F220000) (accessed 10 january 2020)
34. UpToDate. Filgrastim (including biosimilars of filgrastim): Drug information.  
[https://www.uptodate.com/contents/filgrastim-including-biosimilars-of-filgrastim-drug-information?search=filgrastim&source=panel\\_search\\_result&selectedTitle=1~148&usage\\_type=panel&kp\\_tab=drug\\_general&display\\_rank=1#F171247](https://www.uptodate.com/contents/filgrastim-including-biosimilars-of-filgrastim-drug-information?search=filgrastim&source=panel_search_result&selectedTitle=1~148&usage_type=panel&kp_tab=drug_general&display_rank=1#F171247) (accessed 10 january 2020)
35. Anania JC, Chenoweth AM, Wines BD and Hogarth PM The Human FcγRII (CD32) Family of Leukocyte FcR in Health and Disease. *Front. Immunol.* 2019 10:464. doi: 10.3389/fimmu.2019.00464
36. John Adams Fischer, Stefano Rossetti, Nicoletta Sacchi. CSF1R (colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.* 2008(04). *Revista de internet.* (Citado el 10 enero 2020). En: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/CSF1RID40161ch5q32.html>
37. Zhang, X., Goncalves, R., & Mosser, D. M. (2008). The isolation and characterization of murine macrophages. *Current protocols in immunology*, Chapter 14, Unit–14.1. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1401s83>
38. Back J., Dierich A., Bronn C., Kastner P., Chan S. PU.1 determines the self-renewal capacity of erythroid progenitor cells. *Blood* 2004; 103 (10): 3615–3623. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-4089>
39. Li, J., Chen, K., Zhu, L., & Pollard, J. W. (2006). Conditional deletion of the colony stimulating factor-1 receptor (c-fms proto-oncogene) in mice. *Genesis*, 44(7), 328–335. doi:10.1002/dvg.20219
40. Kitamura, N., Ohkouchi, S., Tazawa, R., Ishii, H., Takada, T., Sakagami, T., Tanaka, T., & Nakata, K. (2019). Incidence of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis estimated using Poisson distribution. *ERJ open research*, 5(1), 00190-2018. <https://doi.org/10.1183/23120541.00190-2018>

41. Report any adverse drug reactions to the pharmacy. Vancouver hospital & health sciences centre pharmacy services special access programme drug data sheet. Rev. FEB2015. <http://www.vhpharmsci.com/pdtm/Drug%20Data%20Sheets%20%20SAP%20&%20NF/Sargramostim%20SAP.pdf>
42. Nayak, D. K., Mendez, O., Bowen, S., & Mohanakumar, T. (2018). Isolation and In Vitro Culture of Murine and Human Alveolar Macrophages. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (134), 57287. <https://doi.org/10.3791/57287>
43. AlamarBlue™ Cell Viability Reagent Thermo Fisher Scientific. Invitrogen™. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/DAL1100#/DAL1100>
44. Martín Piedra M. A., Garzón I., Sánchez Quevedo M. C., Alaminos M. Evaluación de la viabilidad celular y patrones apoptóticos en células madre aisladas de la pulpa dental humana. *Actual. Med.* (2012) Vol. 97. Mayo/agosto 2012.6 – 12.
45. TRIzol™ Reagent. Invitrogen User Guide. Catalog Numbers 15596026 and 15596018 Doc. Part No. 15596026.PPS Pub. No. MAN0001271 Rev. A.0 [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol\\_reagent.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf)
46. Protocolo de Extracción de ADN por Buffer G.T. (Guanidil Tiosulfato) DIETILPIROCARBONATO (DEPC). <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/22543/Anexo.pdf>
47. Abbas A., Lichtman A., Pillai S. *Inmunología básica Funciones y transtornos del Sistema inmunitario. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System (4ta Ed.)* España. Elsevier; 2014
48. Huanqui C. *Inmunología básica (8va Ed.)* Universidad Católica de Santa María. Perú; 2014
49. Mora N. y Rosales C. Funciones de receptores Fc en mecanismos de defensa y regulación inmunológica. *Revista de Investigacion Clinica*. 61(4). 2009: 313-326
50. M. Scholz M. Ackermann C. Engel F. Erich M. Loffler M. Kamprad. A pharmacokinetic model of filgrastim and pegfilgrastim application in normal mice and those with cyclophosphamide-induced granulocytopenia. *Cell proliferation*. 2008; 42 (813–822):10

51. Kuwabara T1, Kobayashi S, Sugiyama Y. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Drug Metabolism Reviews*. 1996; 28 (4)







## **ANEXO 1**

# **DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA**



## COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM

---

### DICTAMEN COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Arequipa, 5 febrero 2020

Señorita investigadora Yulisa Lope Choque  
Universidad Católica de Santa María

De mi especial consideración

Me dirijo a usted para hacerle llegar el resultado de la evaluación del proyecto de investigación y dictamen del Comité Institucional de Ética de Investigación denominado “EFECTO DEL FILGRASTIM SOBRE LA ACTIVACIÓN DE PU.1, CD32, M-CSFR EN MACRÓFAGOS MURINOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA PROTEINOSIS ALVEOLAR PULMONAR – AREQUIPA 2020”, presentado por la autora Yulisa Lope Choque.

#### **A. DISEÑO:**

En cuanto al diseño, se trata de un estudio experimental, prospectivo y transversal

#### **B. OBJETIVO:**

Determinar el efecto del filgrastim sobre la activación de PU.1, CD32, M-CSFR r en macrófagos murinos para el tratamiento de proteinosis alveolar pulmonar.

#### **C. ANIMALES SUJETOS DE ESTUDIO:**

12 Ratones





## COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM

---

### D. TÉCNICAS DE ESTUDIO:

Evaluación experimental: Transcripción inversa acoplada y amplificación por PCR (RT-PCR) para los genes de PU.1, CD32, M-CSFR y la electroforesis respectiva

### E. PROTECCIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO:

Se propuso la protección de los animales de estudio para la eutanasia respectiva asegurando que no sientan dolor.

### F. PROCEDIMIENTOS:

Transcripción inversa acoplada y amplificación por PCR (RT-PCR) para los genes de PU.1, CD32, M-CSFR y la electroforesis respectiva

### H. DICTAMEN:

FAVORABLE

**DICTAMEN  
FAVORABLE  
142- 2020**



Comité Institucional de Ética de la Investigación UCSM  
Cualquier duda comunicarse a: [comiteeticainvestigacionucsm@gmail.com](mailto:comiteeticainvestigacionucsm@gmail.com)



COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM

INFORMACIÓN SOBRE INVESTIGACIÓN CON ANIMALES

Complete la información acerca de los animales a utilizar

<b>Título del estudio</b>	EFECTO DEL FILGRASTIM Y SARGRAMOSTIM SOBRE LA ACTIVACIÓN DE PU.1, CD32, M-CSFR ASOCIADO A PROTEINOSIS ALVEOLAR PULMONAR EN MACRÓFAGOS MURINOS - Arequipa 2020	
<b>Tipo de animal</b>	Ratones	
<b>Género:</b>	Hembra <input type="checkbox"/>	Macho <input type="checkbox"/>
<b>Número de animales</b>	12	
<b>Peso</b>	40 a 45 gramos	
<b>Edad</b>	5 meses	
<b>Existe la posibilidad de uso de modelos alternativos:</b> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		
<b>Justifique razones de uso de animales de experimentación:</b>  Comprobar mediante el uso de animales de experimentación el efecto del filgrastim y sargramostim sobre los macrófagos murinos. La enfermedad en estudio es poco frecuente en nuestro medio. En los estudios realizados anteriormente usan ratones.		
<b>Estado del arte sobre similares estudios con uso de animales</b>	<b>Existe estudios similares</b>	<b>Incluya Referencias de estudios similares</b>
	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	
<b>Justifique razones de número de animales:</b> Se usara 12 ratones porque la cantidad de macrófagos que se obtiene de ellos es un número menor.		
<b>Efectos en los animales</b>	<b>Explicar medidas para aliviar</b>	
<b>Dolor</b>	Anestesia	
<b>Estrés</b>	Anestesia	
<b>Lesiones</b>		





COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM

Anestesia					
<b>PROCEDIMIENTOS CON ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN O SUS MUESTRAS</b>					
Condiciones de alojamiento de los animales	Lugar	luz	Alimento	Humedad	Temperatura
	Jaulas	si	Maíz, trigo, cebada	si	32°C
Sedación de animales	Medicamentos	Dosis	Cuidados	Métodos	Personal que hará la sedación
	Cloroformo	5 ml	Si	Inyección	Personal de bioterio
Obtención de material biológico	Muestra a tomar	Métodos		Conservación para reutilizar en otros estudios	
	Líquido ascítico	Extracción mediante inyección de suero fisiológico		SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	
Eutanasia	Método	Número de animales		Justificación	
	Destroncamiento cervical	12		Para poder extraer líquido ascítico	
Manejo de desechos	Tipo de desecho	Muestras contaminadas con:		Medidas de control	
		Químicos SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	Microorganismos SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		
Seguridad para los animales	<b>PROCEDIMIENTOS DE SEGURIDAD</b>				
	Para evitar contagio con otros animales	Para reemplazo		Para reutilización	
	Jaulas individuales	Jaulas individuales		Jaulas individuales	
Seguridad de investigador	Bioseguridad	Uso de EPP		Explique medidas de bioseguridad requiere el equipo de investigación	
	SI <input type="checkbox"/>	SI <input type="checkbox"/>		Mascarilla	





COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM


	NO <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	Mandil Guantes Botas
<b>Relevancia de los resultados</b>	Los resultados obtenidos nos ayudaran a usar un medicamento alternativo que está disponible en nuestro medio para la proteinosis alveolar pulmonar		

**Nombres completos del Investigador:**

**Yulisa Yasmina Lope Choque** \_\_\_\_\_

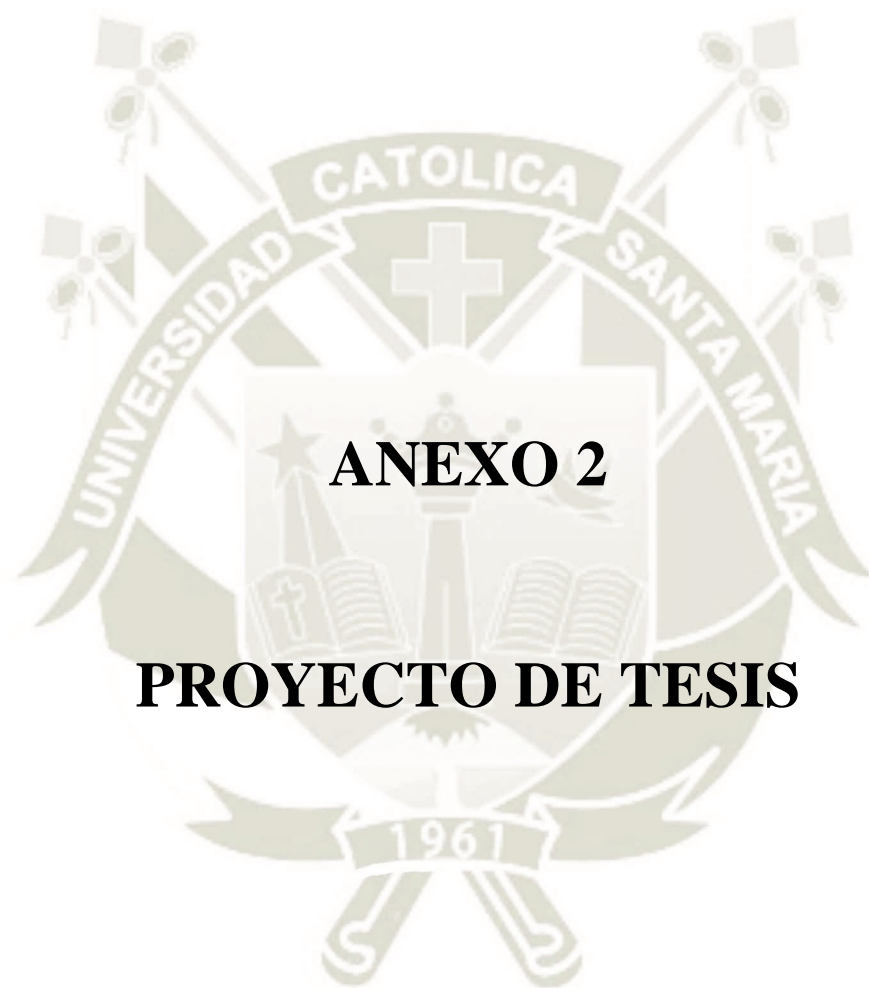
**Email:** azulejo\_1422@hotmail.com \_\_\_\_\_

**Celular:** 960349327 \_\_\_\_\_

  
Yulisa Yasmina Lope Choque  
Matricula No. 2013801002



**Firma del Investigador Principal**



## **ANEXO 2**

# **PROYECTO DE TESIS**

**Universidad Católica de Santa María**  
**Facultad de Medicina Humana**  
**Escuela Profesional de Medicina Humana**



**EFEECTO DEL FILGRASTIM SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CD32 Y M-CSFR EN  
MACRÓFAGOS MURINOS COMO TRATAMIENTO DE LA PROTEINOSIS  
ALVEOLAR PULMONAR- AREQUIPA, 2020**

Proyecto de Tesis presentada por la Bachiller:

**Lope Choque, Yulisa Yasmina**

para optar el Título Profesional de:

**Medico Cirujana**

**Asesor:**

**Dr. Salinas Gamero, Jesús Eduardo**

**Arequipa – Perú**

**2020**

## 1. PREÁMBULO

La Proteínosis Alveolar Pulmonar (PAP) es un síndrome raro que se caracteriza por la acumulación de surfactante en los alvéolos y las vías respiratorias terminales de los pulmones, lo que trae como consecuencia la insuficiencia respiratoria.

El surfactante pulmonar se encarga de mantener la función pulmonar al reducir la tensión superficial y prevenir el colapso alveolar, además de cumplir una función muy importante en la defensa del huésped contra los patógenos microbianos.

El diagnóstico de la proteínosis alveolar pulmonar se puede realizar en función de la historia clínica, estudios imagenológicos, estudios laboratoriales, estudios de función pulmonar, lavado broncoalveolar y/o hallazgos histopatológicos. Sin embargo, para el diagnóstico de la proteínosis alveolar pulmonar secundaria, es decir las enfermedades causantes, es necesario estudios adicionales.

El lavado pulmonar completo ha sido la terapia de primera línea desde la década de los años sesenta y que ha demostrado buenos resultados en los pacientes, también se ha utilizado como tratamiento el lavado lobar y segmentario mediante el uso de un broncoscopio de fibra óptica; sin embargo, actualmente se están desarrollando nuevas terapias farmacológicas prometedoras.

Dentro de ellas se encuentra el tratamiento con Factor estimulante de colonias granulocito macrófago (FEC-GM). Los primeros tratamientos con FEC-GM exógeno en pacientes con proteínosis alveolar pulmonar se administraron por vía subcutánea e inhalatoria y se produjo una buena respuesta al tratamiento, con mínimos efectos adversos.

La proteínosis alveolar pulmonar es una enfermedad rara a nivel mundial y en nuestro medio; sin embargo, considerando que hay una experiencia clínica local en el manejo de ésta patología con filgrastim y resultados favorables. Por lo cual, el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteínosis alveolar pulmonar en el laboratorio.

## 2. PLANTEAMIENTO TEÓRICO

### 2.1. Problema de Investigación

#### 2.1.1. Enunciado del problema

Efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020.

#### 2.1.2. Descripción del problema

##### 2.1.2.1. Área del conocimiento

- 2.1.2.1.1. Área general: Ciencias de la Salud
- 2.1.2.1.2. Área Específica: Medicina Humana
- 2.1.2.1.3. Especialidad: Neumología
- 2.1.2.1.4. Línea: Proteinosis Alveolar Pulmonar

##### 2.1.2.2. Análisis u operacionalización de variables e indicadores

**Variable independiente:** Filgrastim

**Variable dependiente:** Activación de genes

VARIABLE	INDICADOR	UNIDAD /CATEGORÍA	ESCALA
Activación de genes	RT-PCR: CD32 M-CSFR	Disminuido Normal Aumentado	Cualitativa nominal
Filgrastim (FEC-G recombinante)	Dosis	ng/ml	Cuantitativa discreta

### 2.1.2.3. Interrogantes básicas

- ¿Cuál es el efecto del filgrastim en la activación de CD32 en macrófagos murinos de tejido pulmonar en el estudio in vivo como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020?
- ¿Cuál es el efecto del filgrastim en la activación de M-CSFR en macrófagos murinos de tejido pulmonar en el estudio in vivo como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020?
- ¿Cuál es el efecto del filgrastim en la activación de CD32 en macrófagos murinos provenientes de lavado pleural en el estudio in vitro como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020?
- ¿Cuál es el efecto del filgrastim en la activación de M-CSFR en macrófagos murinos provenientes de lavado pleural en el estudio in vitro como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020?
- ¿La dosis administrada de filgrastim activa la expresión de CD32 y/o M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar – Arequipa, 2020?
- ¿Existe diferencia significativa entre el nivel de expresión de actina en los murinos control utilizados para este estudio?
- ¿Existe diferencia significativa entre el nivel de expresión de CD32 en los murinos a quienes se les administró el medicamento filgrastim por vía subcutánea?
- ¿Existe diferencia significativa entre el nivel de expresión de M-CSFR en los murinos a quienes se les administró el medicamento filgrastim por vía subcutánea?

**2.1.2.4. Tipo de investigación**

Básica

**2.1.2.5. Diseño de investigación**

Estudio Experimental, prospectivo y transversal

**2.1.2.6. Nivel de investigación**

Nivel experimental

**2.2. Justificación del problema:**

**Justificación científica:**

Al revisar la literatura internacional, diversos estudios describen sus experiencias y resultados en el tratamiento de la Proteínosis Alveolar Pulmonar a través del FEC-GM (Sargramostim), aportando evidencia científica de su utilidad como prueba terapéutica, asimismo del uso del lavado broncoalveolar pulmonar. Sin embargo, no hay estudios publicados en los que se haya tratado a los pacientes con esta patología con FEC-G (Filgrastim). Es por lo que la relevancia científica de este trabajo radica en su originalidad y carácter de pionero en la documentación de la utilidad del Filgrastim en el tratamiento de la PAP mediante el uso de macrófagos murinos, considerando que hay una experiencia clínica local en el manejo de esta patología con filgrastim y resultados favorables.

**Justificación social:**

El costo social que implica el tratamiento de esta enfermedad es elevado, ya que los tratamientos convencionales no tienen la eficacia suficiente, además que no todos los pacientes responden de la misma manera a determinado tratamiento, siendo necesario tratamientos adicionales, como es uso de fármacos tales como el sargramostim, el cual no se encuentra disponible en nuestro país y si es adquirido del extranjero su costo es muy elevado.

Igualmente, los pacientes afectados tienen una gran limitación de su calidad de vida, asimismo ello trae consecuencias socioeconómicas.

**Justificación contemporánea:**

El uso de fármacos tales como el sargramostim ya sea como alternativa terapéutica o tratamiento complementario al lavado broncoalveolar para la PAP tiene varios años de vigencia en el mundo, sin embargo, como esta patología no es muy frecuente en el mundo y en nuestro país, el sargramostim no es fácil de conseguir en nuestro país, y se tiene que comprar del extranjero y el costo es elevado. Es por ello, que se puede usar como alternativa terapéutica al filgrastim en nuestro medio, porque lo tenemos a nuestro alcance y es barato.

**Factibilidad:**

Al ser un estudio experimental, los murinos se obtendrán del Bioterio de la Universidad Católica de Santa María, y el estudio experimental se llevará a cabo en los laboratorios de la misma universidad, además contamos con el apoyo de docentes de la universidad para ello.

**Justificación personal:**

Soy consciente que esta enfermedad no es muy frecuente a nivel mundial y nacional, pero la posibilidad de contribuir en las mejoras del tratamiento, como alternativa terapéutica al tratamiento convencional. Contribuyendo a demostrar en el laboratorio el efecto del Filgrastim sobre la activación de CD32 y M-CSFR en macrófagos murinos y así demostrar la utilidad de este fármaco en esta patología y ser usado como alternativa terapéutica al sargramostim en nuestro medio, debido a su disponibilidad y costo; es por ello que se realiza este proyecto de investigación.

### 2.3. Marco conceptual

#### PROTEINOSIS ALVEOLAR PULMONAR

##### DEFINICIÓN:

La Proteínosis Alveolar Pulmonar (PAP) es una enfermedad rara que se caracteriza por la acumulación progresiva de sustancia surfactante en los alveolos y vías respiratorias terminales (1), el cual trae como consecuencia en una disfunción de ventilación pulmonar tipo restrictivo, disminución de la capacidad de difusión e incluso podría progresar a insuficiencia respiratoria hipoxémica del paciente. Además del incremento del riesgo de infecciones secundarias y/o fibrosis pulmonar.

Esta patología fue reportada por primera vez en 1958 por Rosen et al, como un desorden que consistía en la acumulación de un material proteico PAS positivo rico en lípidos en los alveolos pulmonares y que actualmente ese material se conoce como sustancia surfactante. Además, esta patología tuvo varias denominaciones anteriormente, tales como: Lipoproteínosis alveolar pulmonar, PAP idiopática, PAP idiopática y PAP congénita (1).

##### EPIDEMIOLOGIA:

La prevalencia de la PAP en Estados Unidos y Japón es de al menos 7 casos por millón de personas, según un estudio realizado en el 2018 (32). La PAP autoinmune tiene una incidencia del 0,49 por millón de personas y una prevalencia del 6,2 por millón de personas, según un estudio realizado en más de 200 pacientes con PAP en un estudio japonés (3). Asimismo, la PAP autoinmune es dos veces más común en los hombres, generalmente se presenta en la tercera a la sexta décadas y la edad promedio es de 51 años, y es rara en niños menores de 10 años. La PAP secundaria representa el 8-9% de todos los casos de PAP, con una incidencia del 0.05 por millón y prevalencia de 0.5 por millón de personas, con una edad media de 53 años en varones y 58 años en mujeres, y la relación hombre: mujer de 1.14:1.0. Es importante

tener en cuenta que se realiza un infra diagnóstico de esta patología, porque puede diagnosticarse como otra enfermedad más común o se presenta como una enfermedad leve y por lo tanto la PAP a menudo permanece sin diagnosticar durante largos periodos de tiempo. (1, 7).

Los factores de riesgo que están asociados a esta patología son la exposición a diversos agentes ambientales, tales como: El humo del tabaco (en la mayoría de los casos), gases, polvos orgánicos e inorgánicos (32).

### **CLASIFICACIÓN:**

La Proteínosis Alveolar Pulmonar se clasifica en:

**PAP autoinmune** (también conocida como idiopática o adquirida), causada por altos niveles de auto anticuerpos anti-FEC-GM en los pulmones, estos son los más frecuentes, representa más del 90% de todos los casos de PAP. Además, se considera que fumar y la exposición por inhalación ocupacional al polvo o partículas aumenta el riesgo de PAP, un estudio realizado a 227 pacientes con PAP autoinmune (57% de los pacientes tenían antecedentes de tabaquismo) y otro estudio realizado a 199 pacientes con PAP autoinmune (26% tuvo antecedente de exposición a dichos elementos) (32).

**PAP hereditaria o congénita**, causado por las mutaciones en los genes del receptor FEC-GM con una frecuencia menor al 1% (1, 29).

**PAP secundaria** es el resultado de enfermedades subyacentes que presumiblemente alteran la eliminación de surfactante porque alteran el número o funciones de los macrófagos alveolares, incluido el catabolismo del surfactante alveolar, tiene una frecuencia del 8 a 9%, las enfermedades subyacentes son:

- Enfermedades hematológicas: Síndrome mielodisplásico, leucemia mielógena aguda, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, anemia aplásica, linfoma, y otros)

- Síndrome de inhalación tóxica como: Humo del Cigarro, cloro, dióxido de nitrógeno, productos de limpieza, gasolina, petróleo, pintura, humos plásticos sintéticos, barniz. Polvo orgánico: Agrícola, fertilizante, harina de panadería, aserrín. Polvo inorgánico: Aluminio, cemento, sílice, titanio, indio
- Enfermedades infecciosas: Pneumocystis jiroveci, Nocardia, Citomegalovirus, Mycobacterium tuberculosis.
- Síndrome de deficiencia inmune
- Tumores malignos: Adenocarcinoma de pulmón, melanoma, glioblastoma.

Y las patologías subyacentes más asociadas a esta enfermedad son los desórdenes hematológicos en más del 75% de los casos, y dentro de ellas los síndromes mielodisplásicos (1). En un estudio de cohorte retrospectivo realizado en Japón, se demostró que la PAP está asociado a un mal pronóstico, ya sea por la propia PAP o las infecciones asociadas a la PAP (31).

### **PATOGENIA:**

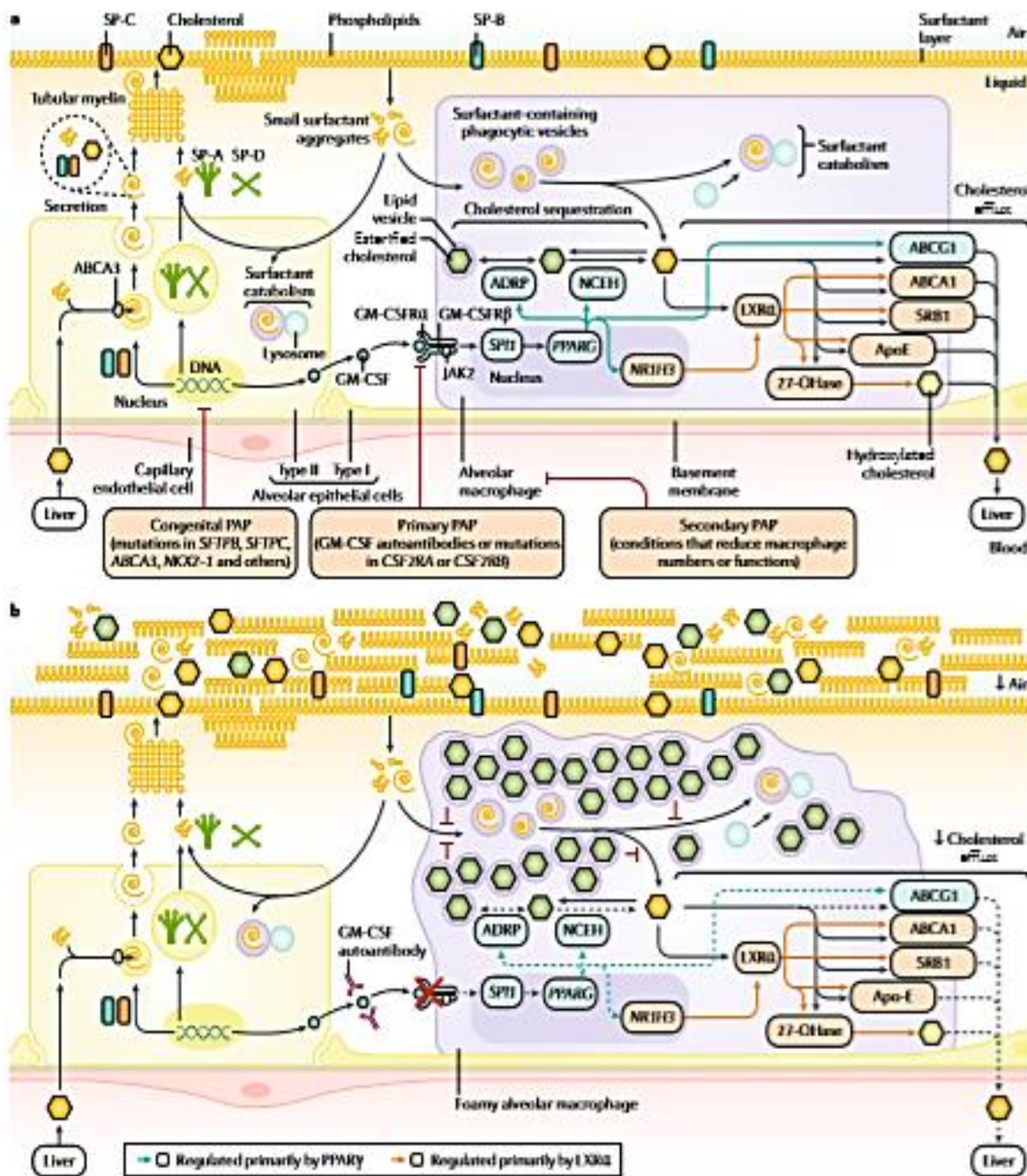
La PAP se caracteriza por la acumulación de surfactante en los alveolos causados por la reducción del aclaramiento pulmonar, mas no del aumento de la producción. La síntesis y secreción intraalveolar del surfactante en ésta patología es normal, realizado por las células epiteliales alveolares tipo II; y la eliminación de la sustancia surfactante se realiza por absorción y reciclaje en las células epiteliales tipo II o por absorción y catabolismo en los macrófagos alveolares. Para el catabolismo del surfactante en los macrófagos alveolares juega un papel importante el FEC-GM, una citocina glicoproteica de 23 KDa producida por las células epiteliales alveolares tipo II entre otras, mediante la unión a los receptores de la superficie celular que comprenden una subunidad alfa (de baja afinidad) y beta (que no se une y mejora la afinidad), la unión provoca la activación de JAK2 y el inicio de la señalización a través de múltiples vías, incluida la activación del factor de transcripción PU.1 y el receptor de peroxisoma proliferador activado gamma (PPAR $\gamma$ ) y otros. En la PAP la señalización del FEC-GM esta alterada, ya sea por la presencia de auto anticuerpos

anti FEC-GM o mutaciones en los receptores del FEC-GM, lo cual da origen a macrófagos alveolares disfuncionantes y por consiguiente la acumulación de surfactante en los espacios alveolares (1, 2). La alteración en la señalización del FEC-GM en la PAP autoinmune también causa niveles reducidos de PU.1, un factor de transcripción regulado por el FEC-GM.

El FEC-GM no solo es un factor estimulante del crecimiento celular hematopoyético que estimula la proliferación y diferenciación de las células de la médula ósea (células madre), sino que también regula la capacidad de absorción y catabolismo de los macrófagos alveolares, por lo cual tiene una función importante en el equilibrio del surfactante pulmonar (29).

El surfactante pulmonar mantiene la función pulmonar al crear una interfaz aire-líquido en la superficie alveolar, debido a que reduce la tensión superficial y previene el colapso alveolar. Está compuesto por un 80% de fosfolípidos (principalmente fosfatidilcolina), 10% de lípidos neutros (principalmente colesterol y en menor proporción triglicéridos y ácidos grasos) y 10% de proteínas surfactantes (proteínas surfactantes tipo A, B, C y D) (32). Las proteínas surfactantes tipo A y D son importantes para la defensa del huésped pulmonar, opsonizando y matando directamente varios patógenos microbianos, la proteína surfactante tipo B contribuye a la organización y al empaquetado del surfactante en cuerpos lamelares durante la biogénesis, la proteína surfactante tipo C contribuye a la formación y mantenimiento de capas de surfactante en la interfaz aire-líquido (2). Y la otra función de la sustancia surfactante es la defensa del huésped contra los patógenos microbianos.

El surfactante pulmonar es sintetizado y secretado por las células epiteliales alveolares tipo II, a su vez estos últimos se encargan de la eliminación por captación, reciclaje y catabolismo; y la eliminación por captación y catabolismo del surfactante pulmonar en los macrófagos alveolares (1). FEC-GM juega un papel crítico en el catabolismo del surfactante en los macrófagos alveolares, pero no regula la captación de surfactante por parte de estas células (2).



Tomado de: Trapnell, Nakata, Bonella, Campo, Griese, Hamilton, Tisha Wang, Morgan, Cottin and Cormac McCarthy. Pulmonary alveolar proteinosis. *Nat Rev Dis Primers* 2019.5,16 (32).

Los autoanticuerpos FEC-GM son policlonales, compuestos principalmente de IgG1 e IgG2. Además, los autoanticuerpos FEC-GM también están presentes en personas sanas, pero a niveles mucho más bajos en comparación de los pacientes con PAP, estos datos sugirieron la hipótesis de que el riesgo de PAP aumenta cuando los niveles de autoanticuerpos FEC-GM aumentan por encima de un umbral crítico (aproximadamente 5  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) (2). Entre los pacientes con PAP autoanticuerpos negativos para FEC-GM, se identificaron mutaciones genéticas de los genes alfa y beta del receptor FEC-GM (FEC2RA y FEC2RB, respectivamente). Es importante recordar que el FEC-GM es una citoquina de 23 kDa producida por varias células que se une a receptores heterólogos de la superficie celular que comprenden una glicoproteína  $\alpha$  de unión a FEC-GM de baja afinidad y una glicoproteína  $\beta$  de unión a afinidad no vinculante (2). La alteración de la señalización de FEC-GM por mutaciones recesivas en FEC2RA o FEC2RB causa una forma hereditaria de PAP que es clínicamente, fisiológicamente, e histológicamente indistinguible de PAP autoinmune. Estas formas genéticas de PAP ahora se clasifican como PAP hereditarias. La PAP hereditaria representa menos del 1% de los casos (1).

### **MANIFESTACIONES CLÍNICAS:**

Los síntomas comunes de la PAP incluyen disnea de esfuerzo, tos, fatiga y pérdida de peso. En la PAP autoinmune, suele haber antecedente de tabaquismo (57% según una la cohorte japonesa, 79% en la cohorte alemana y 64% en la cohorte italiana), y se ha informado de exposición a polvo o humo (26% en la cohorte japonesa, 54% en alemán cohorte, y 32% en cohorte italiana). La fiebre y la producción de esputo son menos comunes. En la PAP secundaria con síndrome mielodisplásico, los síntomas más comunes son fiebre (45%), disnea de esfuerzo (42%) y tos (42%). En varios estudios, dos tercios de los pacientes eran hombres (hombre/mujer 2.2/1). El examen físico generalmente es normal, pero en algunos pacientes se han reportado crepitaciones y cianosis (1,7,8,9).

**DIAGNOSTICO:**

El diagnóstico de la PAP se suele basar en una historia clínica compatible con la enfermedad, hallazgos imagenológicos típicos, citología del lavado broncoalveolar y/o hallazgos de biopsia de pulmón, y biomarcadores compatibles. Asimismo, para el diagnóstico etiológico de la PAP secundaria se requiere de estudios adicionales. Las pruebas de autoanticuerpos anti-FEC-GM tempranas son útiles para realizar el diagnóstico de la PAP autoinmune, es por ello que los pacientes con autoanticuerpos anti-FEC-GM en suero elevados, pero sin enfermedades subyacentes asociadas con PAP se diagnostican con PAP autoinmune; los pacientes con autoanticuerpos anti-FEC-GM en suero negativos y con enfermedades subyacentes asociados a PAP se diagnostican como PAP secundaria; los pacientes con autoanticuerpos anti-FEC-GM en suero negativos y niveles elevados de FEC-GM en suero sin enfermedades subyacentes asociadas con la PAP necesitan una evaluación adicional de la PAP hereditaria mediante el análisis de las mutaciones del gen del receptor de GM-CSF (*FEC2RA* o *FEC2RB*).

*Estudios imagenológicos:*

La radiografía de tórax puede ser una prueba de detección útil para el diagnóstico de PAP, donde la distribución de los infiltrados pulmonares ya sea en la PAP autoinmune y hereditaria son típicamente opacidades simétricas bilaterales en los campos pulmonares medio e inferior. En la tomografía computarizada de alta resolución (TCAR) se muestra opacidades en vidrio esmerilado en la PAP autoinmune, hereditaria y secundaria; las opacidades en vidrio esmerilado se presentan como un patrón geográfico parcheado en los campos pulmonares inferiores en la PAP autoinmune, mientras que en la PAP secundaria se presentan como un patrón difuso (1). En la PAP autoinmune con frecuencia se observa opacidades en vidrio esmerilado asociados a un engrosamiento del septo interlobular consistente con un patrón de "pavimentación loca" se llama así debido a su parecido con los caminos empedrados de forma irregular (4).

### *Estudios de laboratorio:*

La mayoría de las pruebas de laboratorio de rutina son normales en la PAP. El lactato deshidrogenasa (LDH) sérico suele ser elevado, pero este hallazgo es inespecífico. LDH y presión parcial de oxígeno en la sangre arterial (PaO<sub>2</sub>) están moderadamente correlacionados y LDH y gradiente de oxígeno alveolar-arterial (A-aO<sub>2</sub>) están más significativamente correlacionados (7). De manera similar se ha evidenciado niveles elevados de proteína surfactante tipo A, B y D pero, este hallazgo también está presente en otras patologías. Sin embargo, la proteína similar a la mucina KL-6 esta aumentada en esta enfermedad y parece correlacionarse con la gravedad de la enfermedad (1, 5).

### *Pruebas de función pulmonar*

Las pruebas de función pulmonar tienen una utilidad limitada para diagnosticar la gravedad de la PAP. El aumento del A-aO<sub>2</sub> se correlaciona mejor con la gravedad de la enfermedad, de manera similar la capacidad de difusión del pulmón para el monóxido de carbono (CDCO) que se reduce con frecuencia y se correlaciona con la gravedad de la enfermedad. La capacidad vital forzada (CVF) y volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF1) están generalmente dentro de los límites normales (1,9).

### *Lavado broncoalveolar*

El líquido del lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes con PAP es opaco y de aspecto lechoso, cuando se deja reposar el líquido se separa espontáneamente en un sobrenadante amarillo pálido, casi translúcido y un sedimento espeso. El diagnóstico de esta enfermedad se puede establecer definitivamente con el LBA, como se demuestra en estudios donde el 4% de los 410 casos publicados en 2002 al 83% en series alemanas en 2011 se usa el LBA como diagnóstico (7,12). En una cohorte japonesa, el diagnóstico de PAP se basó en el análisis de TCAR y LBA en el 58,7% de los pacientes; TCAR, LBA y biopsia pulmonar transbronquial (BPTB) en el 34,1% de los pacientes; y análisis de LBA o BPTB y cirugía toracoscópica asistida por video (VATS) en el 7,2% de los pacientes (9). La citología del LBA muestra macrófagos

alveolares agrandados, vacuolados y de aspecto espumoso. La microscopía electrónica muestra la presencia de mielina tubular, cuerpos lamelares y estructuras de membrana fusionadas dentro del material extracelular amorfo. Estas características microscópicas electrónicas son morfológicamente las mismas que las del surfactante. (1, 5). El uso del LBA y la medición de autoanticuerpos anti-FSC-GM en suero en muchos casos elimina la necesidad de confirmación histológica para el diagnóstico de PAP.

#### *Biopsia pulmonar*

La biopsia pulmonar muestra alvéolos y bronquios terminales llenos de material eosinofílico, granular y PAS positivo y macrófagos alveolares espumosos, puede haber un leve infiltrado linfocítico en el intersticio. Además, es importante destacar que la arquitectura del pulmón se conserva. En casos avanzados, se pueden desarrollar cambios fibróticos, que pueden conducir a distorsión arquitectónica, aunque esto no es común. La histopatología de la PAP revela alvéolos bien conservados llenos de material eosinofílico, granular y PAS positivo y macrófagos alveolares espumosos. Se asocia con una mínima inflamación intersticial o fibrosis (5).

#### *Biomarcadores:*

La mayoría de estos biomarcadores son útiles para monitorear la actividad de la enfermedad en pacientes con PAP (1). En la PAP autoinmune, el autoanticuerpo anti-FEC-GM está elevado en suero, cuya sensibilidad y especificidad se acerca al 100%. Los niveles de autoanticuerpos anti-FEC-GM en suero no se correlacionan con la duración de la enfermedad, la gravedad de la enfermedad, la función pulmonar o biomarcadores séricos (9), tampoco se correlaciona con la edad, el sexo, el estado de fumador, o antecedente de exposición a la inhalación de polvo ambiental. Pero si los pacientes tienen autoanticuerpos anti-FEC-GM son negativos y tienen una enfermedad subyacente asociada se diagnostican como PAP secundaria. En la PAP hereditaria el FEC-GM en suero está elevado, además hay aumento del FEC-GM no asociados a enfermedad subyacente; en ese caso se recomienda la evaluación genética (12). Las pruebas del índice de fosforilación STAT5 inducida por FEC-GM (STAT5-

PI) pueden respaldar el diagnóstico de PAP primaria (12). Los niveles séricos de LDH, KL-6 y CEA se correlacionan con algunos marcadores de la función pulmonar (PaO<sub>2</sub>, AaO<sub>2</sub> o CDco) (10,11). Los biomarcadores de cáncer distintos de CEA, como NSE y Cyfra 21-1, también están elevados en PAP (13).

### **TRATAMIENTO:**

El tratamiento para la PAP ha evolucionado con el tiempo, en ese entonces se intentó el tratamiento fallido con drenaje postural, antibióticos y corticoides, a diferencia del lavado pulmonar completo. En 1964, el Dr. Ramírez-Rivera realizó con éxito el lavado pulmonar completo (LPC) (14, 16) y se ha aplicado en la práctica clínica por casi 50 años para pacientes con PAP, con una tasa de respuesta que varía del 70 al 84% (6). El procedimiento de LPC se lleva a cabo en sala de operaciones bajo anestesia general utilizando un tubo endotraqueal de doble lumen, un lumen para ventilar un pulmón y otro lumen para el otro pulmón que se llena y vacía repetidamente con hasta 50 litros de suero fisiológico para eliminar físicamente el surfactante del pulmón. Aunque muchos pacientes con PAP han sido tratados con LPC, los procedimientos aún no están estandarizados y depende mucho del operador (7,11,16). También se ha informado el lavado lobar y segmentario realizado con un broncoscopio de fibra óptica, si bien este procedimiento puede parecer menos efectivo en comparación con el LPC debido al pequeño volumen de lavado, un estudio informó que los dos métodos parecen utilizarse a frecuencias similares en el tratamiento de los pacientes (16).

Terapia para la PAP autoinmune: El descubrimiento de que los ratones deficientes en FEC-GM desarrollan un trastorno que se parece a la PAP y se resuelve cuando se reemplaza el FEC-GM, llevó a la hipótesis de que la terapia con FEC-GM podría ser efectiva en humanos con esta patología. El primer estudio prospectivo de la terapia con FEC-GM en pacientes con PAP comenzó en 1995. Hasta ahora hay muchos estudios que informan el uso de FEC-GM para la PAP, sin embargo, no se ha establecido un estándar uniforme en relación a la duración del tratamiento y dosis del

fármaco, pero según Fen et al. el curso total del tratamiento varia de 3 a 36 meses, y las dosis de inyección subcutánea varia de 3 a 20  $\mu\text{g}$  /kg/día (29). En el 2018 una revisión sistemática actual se evaluó el efecto del tratamiento con FEC-GM exógeno incluida las dos vías de administración (vía inhalatoria y vía subcutánea) del tratamiento con FEC-GM exógeno en los pacientes con PAP autoinmune. Y se comprobó que el FEC-GM tiene efecto en los pacientes con PAP autoinmune, con una tasa de respuesta del 81% y una tasa de recaída del 22%, asimismo el FEC-GM inhalado fue más efectivo que la terapia subcutánea con una tasa de respuesta del 89% en comparación a un 71%. Además, la terapia combinada, es decir el LPC con FEC-GM tuvo una tasa de respuesta del 81% (5, 6). Además, McCarthy et al. sugirió que mediante el uso de estatinas, se podría reducir el nivel de colesterol en los macrófagos alveolares, y podría mejorar la función de los macrófagos disfuncionales, sin embargo, son necesarios más estudios, es por ello que el FEC-GM todavía se considera el principal fármaco terapéutico para la PAP (30).

Terapia para la PAP secundaria: Se debe tratar la enfermedad subyacente o se debe retirar al paciente de la exposición al agente ambiental sospechoso. El tratamiento adicional con LPC aún puede ser necesario (5).

Terapia para la PAP congénita: Desafortunadamente, la PAP congénita no responde bien al LPC, en la actualidad, el trasplante de pulmón parece ser la única opción terapéutica en casos de PAP congénita (5).

Hay tratamientos que todavía están en investigación. Aunque algunos de estos enfoques experimentales son prometedores, se necesitan más estudios de eficacia y seguridad antes de poder extraer conclusiones sobre su utilidad potencial en el tratamiento de pacientes con PAP (1). Los primeros tratamientos con FEC-GM exógeno en pacientes con PAP se administraron por vía subcutánea (17). El uso de FEC-GM subcutáneo en dosis crecientes durante 6 a 12 meses produjo una tasa de respuesta global del 48%. En este estudio, el 85% de los pacientes que recibieron FEC-GM subcutáneo tuvo reacciones locales en el lugar de la inyección y otros eventos adversos menores. La terapia de inhalación de FEC-GM en aerosol también se ha probado en PAP (19). Como otra estrategia terapéutica se informó la terapia con

células anti-B con rituximab para la PAP autoinmune. La plasmaféresis para la PAP autoinmune también puede eliminar los autoanticuerpos anti-FSC-GM (5).

Sargramostim es un análogo del FEC-GM humano expresando un gen recombinante en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (22); producido por ingeniería genética de ADN recombinante en una levadura. Sargramostim es una glicoproteína que contiene 127 aminoácidos similar al FEC-GM humano, sin embargo, la secuencia de aminoácidos de sargramostim se diferencia del FEC-GM humano por la sustitución de leucina en la posición 23, y la porción de carbohidratos puede ser diferente de la glicoproteína nativa. Es una mezcla de tres versiones de FEC-GM que tienen pesos moleculares de 19,500, 16,800 y 15,500 Daltons. Sargramostim ha sido seleccionado como el nombre propio de rhu FEC-GM derivado de la levadura (23). Tiene dos presentaciones: Líquida y liofilizada.

*Mecanismo de acción:* El FEC-GM endógeno actúa sobre las células hematopoyéticas mediante la unión a receptores específicos en la membrana celular, estimulando la proliferación y diferenciación celular, y en ocasiones activando la función celular. En el caso del sargramostim, tiene acción sobre las células progenitoras mieloides, para que se diferencien en granulocitos y monocitos, y de manera secundaria la producción de eosinófilos; sin embargo, este fármaco no tiene ningún efecto sobre las células precursoras de glóbulos rojos y plaquetas. Actividades quimiotácticas, antifúngicas y antiparasitarias de granulocitos y monocitos se incrementan por la exposición a sargramostim in vitro. Además, aumenta la citotoxicidad de los monocitos hacia ciertas líneas celulares neoplásicas y activa los neutrófilos polimorfonucleares para inhibir el crecimiento de las células tumorales (23, 33).

*Farmacocinética y farmacodinamia:* Este fármaco aumenta los glóbulos blancos en 7 a 14 días, y estas células vuelven a la línea de base dentro de 7 a 14 días después de suspender el tratamiento. Tiene una biodisponibilidad del 75% si se administra vía subcutánea. La concentración máxima del fármaco administrado vía endovenosa fue inmediatamente después la perfusión y 2.5 a 4 horas administrado vía subcutánea. La semivida del fármaco es de 0.9 a 2.5 horas en niños de 6 meses a 15 años y de 1.4 horas en adultos. La administración es por vía endovenosa (infundir durante 2, 4 o 24

horas) o vía subcutánea (aplicarlo en la zona del muslo, abdomen o parte superior del brazo externo) (33).

*Indicaciones:* El uso del fármaco está siendo usado en adultos y niños en leucemia mieloide aguda luego de la quimioterapia de inducción, reconstitución mieloide luego del trasplante alogénico y autólogo de médula ósea, reconstitución mieloide luego del trasplante autólogo de células progenitoras de sangre periférica, profilaxis primaria de neutropenia en pacientes que reciben quimioterapia o que tienen un alto riesgo de neutropenia febril, neuroblastoma de alto riesgo, síndrome de lesión por radiación hematopoyética aguda. Experiencia clínica en leucemia mielógena aguda post quimioterapia, falla de trasplante de médula ósea o retraso en el injerto, PAP.

*Contraindicaciones:* Sargramostim está contraindicado en pacientes con antecedentes de hipersensibilidad al fármaco, productos derivados de levaduras o cualquier componente de la formulación del fármaco, pacientes con blastos mieloides leucémicos excesivos en la médula ósea o sangre periférica ( $\geq 10\%$ ) (23, 33).

*Reacciones adversas:* En general, sargramostim es bien tolerado, en estudios realizados no se observaron diferencias significativas en la incidencia de reacciones adversas en pacientes tratados con el fármaco y placebo. Sin embargo, en algunos pacientes que tenían falla hepática o renal se observó la elevación de la creatinina y la bilirrubina sérica / enzimas hepáticas. Las reacciones adversas más frecuentes son: Hipertensión (34%), derrame pericárdico (4 - 25%), malestar (57%), cefalea (26%), cambios en la piel (77%), erupción cutánea (44%), glucosa sérica elevada (49%), pérdida de peso (37%), diarrea (81 - 89%), náuseas (58% - 70%), vómitos (46% - 70%), dolor abdominal (38%), fiebre (81%), anormalidad en las pruebas de laboratorio (58%, metabólica), astenia (66%), artralgia (11% a 21%) y otros (33).

*Implicaciones en el embarazo:* Los estudios respecto al uso del fármaco en el embarazo son limitados. Si es necesario su uso durante el embarazo, se recomienda la forma liofilizada. Y durante la lactancia materna, no se recomienda amamantar durante el tratamiento hasta dos semanas después de la última dosis del fármaco.

## FILGRASTIM

Filgrastim es un factor estimulante de colonias granulocito (FEC-G), producido mediante tecnología de recombinación genética, es una proteína de 175 aminoácidos con una secuencia de aminoácidos similar a la secuencia del ADN humano, con la excepción de la adición de una metionina N-terminal necesaria para la expresión en *Escherichia coli*. Tiene un peso molecular de 18,800 daltons. Debido a que el filgrastim se produce en *E. coli*, el producto no está glicosilado y, por lo tanto, difiere del FEC-G aislado de una célula humana (24).

El FEC-G endógeno es un factor estimulante de colonias específico del linaje que es producido por monocitos, fibroblastos y células endoteliales; se encarga de la estimular la producción, maduración y activación de neutrófilos para aumentar tanto su migración como su citotoxicidad. (24).

***Mecanismo de acción:*** El FEC-G actúa sobre un receptor específico situado en la membrana celular de las células progenitoras hematopoyéticas y en los neutrófilos maduros. El filgrastim aumenta la producción de neutrófilos en la médula ósea, sin aumentar el número de basófilos, eosinófilos o monocitos; y durante su administración se ha observado cambios morfológicos en los neutrófilos, que consisten en la aparición, movilización y liberación de los gránulos citoplasmáticos densos hacia las bacterias. Por consiguiente, se produce el aumento de la capacidad fagocítica de los neutrófilos producción de anticuerpos letales.

***Farmacocinética farmacodinamia:*** Este fármaco aumenta los neutrófilos en 1 a 2 días, y estas células vuelven a la línea de base dentro de 4 días después de suspender el tratamiento. Tiene una biodisponibilidad del 60 a 70% si se administra vía subcutánea. La semivida del fármaco es de 4.4 horas neonatos y de 3.5 horas en adultos. La concentración máxima se logra a las 2 a 8 horas de administrado el fármaco vía subcutánea (34).

***Indicaciones:*** En adultos y niños se usa en: Post quimioterapia de inducción o consolidación en leucemia mieloide aguda, trasplante de médula ósea, neutropenia asociada al tratamiento de la hepatitis C y en la infección avanzada por VIH,

neutropenia crónica grave, neutropenia inducida por quimioterapia, anemia en el síndrome mielodisplásico, mielosupresión inducida por quimioterapia en neoplasias malignas no mieloides y tumores malignos no mieloides, movilización de células madre hematopoyéticas en el trasplante autólogo en pacientes con linfoma no Hodgkin o mieloma múltiple, y otros (34).

Experiencia clínica en pacientes con cáncer que reciben quimioterapia mielosupresora o reciben trasplante de médula ósea, pacientes con leucemia mieloide aguda que reciben quimioterapia de inducción o consolidación, neutropenia crónica severa (24), aunque su uso en los síndromes mielodisplásicos y la leucemia se debe considerar como experimental en espera de la disponibilidad de más datos clínicos (20). Los hallazgos preliminares sugieren que la administración conjunta de filgrastim con los medicamentos antivirales zidovudina o ganciclovir es eficaz para atenuar la leucopenia asociada con estos agentes, lo que permite continuar la terapia en trastornos como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (20).

**Contraindicaciones:** Filgrastim está contraindicado en pacientes con antecedentes de reacción alérgica grave a FEC-G humano como filgrastim o pegfilgrastim, productos derivados de E. coli o cualquier componente de la formulación del fármaco.

**Reacciones Adversas:** Los datos disponibles indican que el filgrastim es generalmente bien tolerado. Entre las reacciones adversas se encuentran: náuseas (43%), dolor óseo (11% a 30%), fiebre (8 - 48%), fatiga (20%), mareos (14%), trombocitopenia (5% a 38%), elevación de la fosfatasa alcalina sérica (6% a 11%) y otros. La reacción adversa más frecuente es el dolor óseo medular leve a moderado, en el 20% de los pacientes, aunque esto generalmente se puede controlar con analgésicos simples sin la necesidad de interrumpir el tratamiento (20).

### *FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN PU.1*

PU.1 es un factor de transcripción codificado por el protooncogén Sfp1 en ratones y SPI1 en humanos, la proteína PU.1 tiene 272 aminoácidos y tiene dominio de factor de transcripción activado en sus 100 aminoácidos N terminales y un dominio de unión

al ADN en sus 112 aminoácidos C terminales. PU.1 actúa a nivel del núcleo y reconoce secuencia de ADN que contienen el nucleótido “PU-box”.

**Expresión:** PU.1 se expresa en niveles más altos en células de linaje mieloide, a niveles similares en células madre hematopoyéticas y tipos de progenitores hematopoyéticos; su expresión aumenta sustancialmente durante la diferenciación a granulocitos y macrófagos, y disminuye durante la diferenciación a plaquetas, eritrocitos y linfocitos T / B. La concentración de PU.1 es importante para el desarrollo y función de las células mieloides y células B, ya que la concentración de PU.1 es cinco veces más en macrófagos que en células B. El aumento de PU.1 está asociado a un aumento de eritrocitos y bloqueo del desarrollo de las células T y B; y su disminución está asociado a leucemias (15).

**Función:** PU.1 se requiere para generar la mayoría de los linajes mieloides (además de macrófagos, neutrófilos y células dendríticas) y células B, parcialmente prescindible para generar células eritroides e imprescindible para generar megacariocitos. Además, es importante para la diferenciación de las células del sistema inmune innato y adquirido. Asimismo, PU.1 activa la transcripción de receptores de citosinas en macrófagos, neutrófilos, linfocitos y células dendríticas; y receptores para el FEC-G/FEC-M/FEC-GM, cuyos receptores son: Receptor FEC-M (codificado por CSF1R), receptor FEC-G (codificado por CSF3R) y el receptor FEC-GM (heterodimérico, compuesto por subunidades alfa (CSF2RA) y beta (CSF2RB) (15).

Se ha demostrado que la mutación del gen PU.1 causa una reducción severa en los progenitores mieloides (granulocitos / macrófagos) y retraso en la producción de neutrófilos y linfocitos T. Es importante recordar que el FEC-GM estimula la diferenciación terminal de los macrófagos alveolares a través del factor de transcripción PU.1 (25). El factor de transcripción PU.1 de *Mus musculus* (ratón de casa) también conocido como Spi.1, se expresa en bazo (RPKM 51.8), pulmón (RPKM 18.0) y otros 15 tejidos. Proteína transformadora de 31 kDa,

## CD32

La familia Fc $\gamma$ RII humana (también conocida como CD32) es una familia de proteínas receptoras de membrana celular, que están codificadas por las variantes de empalme de ARNm de tres genes muy relacionados FCGR2A, FCGR2B y FCGR2C, que surgieron por recombinación de los genes FCGR2A y FCGR2B. Es importante destacar que los miembros de la familia Fc $\gamma$ RII humana son Fc $\gamma$ RIIA, B y C (los tipos A y C son receptores de tipo activador y los de tipo B son de tipo inhibidor); y los miembros de la familia Fc $\gamma$ RII en ratón es Fc $\gamma$ RIIB.

**Expresión:** Las proteínas Fc $\gamma$ RIIA son exclusivas de los primates, Fc $\gamma$ RIIA1 el más abundante se expresa en células de Langerhans, leucocitos y plaquetas; Fc $\gamma$ RIIA2 presente en células de Langerhans y plaquetas; y Fc $\gamma$ RIIA3 presente en neutrófilos y monocitos. Las proteínas Fc $\gamma$ RIIB presente en humanos y ratones, Fc $\gamma$ RIIB1 altamente expresado en células B y menos expresado en monocitos; y Fc $\gamma$ RIIB2 altamente expresado en basófilos y en bajos niveles en monocitos y neutrófilos. Las proteínas Fc $\gamma$ RIIC se expresa en células NK y células B. En caso de ratones de casa se expresa en riñón (RPKM 19.1), bazo (RPKM 16.7) y otros 21 tejidos. Localizado en 1 H3; 1 78.02 cM. Contiene 8 exones (35).

**Función:** Todos los Fc $\gamma$ RII se unen a IgG1 e IgG3 humanas, pero hay diferencias significativas en la interacción con IgG2 e IgG4; Fc $\gamma$ RIIA más afinidad por IgG2, Fc $\gamma$ RIIB y C más afinidad por IgG4. Los receptores Fc $\gamma$ RII y sus variantes juegan un papel importante en la respuesta inmune saludable frente a la infección, patologías de autoinmunidad y la eficacia del tratamiento terapéutico en cáncer (35). Estos receptores ejercen diferentes funciones en la opsonización, fagocitosis y citotoxicidad. El entrecruzamiento de varios de estos receptores con inmunocomplejos provoca la activación de la célula respectiva, en el caso de células fagocíticas supone un aumento de esa actividad facilitadora.

## RECEPTOR DEL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS MACRÓFAGO (M-CSFR)

También conocido como receptor del factor estimulante de colonias 1 (CSF1R) o CD115, es una proteína codificada por el gen CSF1R, es un receptor para una citocina llamada factor estimulante de colonias 1, una citocina que controla la producción, diferenciación y función de los macrófagos.

**Expresión:** El sitio de mayor expresión es en los macrófagos (precursores de macrófagos, monocitos y macrófagos de tejidos, su expresión esta aumentada durante la diferenciación monocítica y disminuida durante la granulopoyesis. Durante la hematopoyesis CSF1R está activado de manera sinérgica con el factor de transcripción PU.1. CSF1R se localiza en la membrana plasmática de la célula (36).

**Función:** CSFR-M es una glicoproteína transmembrana que se une a la citocina a través de un proceso de oligomerización y transfosforilación, por medio del cual se produce el crecimiento, proliferación y diferenciación del macrófago (36). El Receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos de *Mus musculus* (ratón de casa) tiene una expresión amplia en bazo (RPKM 69.7), placenta (RPKM 34.8) y otros 23 tejidos. Localizado en 18 E1; 18 34.41 cM, Contiene 24 exones. También conocido como Fms; Fim2; CD115; Csfmr; Fim-2; CSF-1R; M-CSFR; M-CSF-R.

### Análisis de antecedentes investigativos:

#### *A nivel internacional:*

1. **Autor:** Tracey L. Bonfield, Baisakhi Raychaudhuri, et al.

**Título:** PU.1 regulation of human alveolar macrophage differentiation requires granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

**Revista:** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol

**Resumen:** “El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (FEC-GM) está implicado de manera crítica en la homeostasis pulmonar en el

modelo de ratón knockout de FEC-GM. Estos animales desarrollan una lesión pulmonar muy similar a la proteinosis alveolar pulmonar (PAP) observada en humanos. El desarrollo de la proteinosis alveolar humana en adultos no se debe a la ausencia de un gen o defecto del receptor de FEC-GM, sino a la presencia de auto anticuerpos anti-FEC-GM. Se desconoce el papel de FEC-GM en el desarrollo de PAP. Sin embargo, los estudios en el ratón knockout de FEC-GM han demostrado que la falta de la expresión de la proteína PU.1 en macrófagos alveolares se correlaciona con una disminución de la maduración, la diferenciación y el catabolismo de la sustancia surfactante. El objetivo de este estudio es investigar la expresión de PU.1 in vitro e in vivo en macrófagos alveolares de humanos con PAP, además de investigar la regulación de PU.1 por FEC-GM. En este estudio se demostró por primera vez que la expresión del ARNm de PU.1 es deficiente en comparación con los controles sanos en células de lavado broncoalveolar en la PAP. Asimismo, los marcadores de diferenciación terminal dependientes de PU.1 tales como: CD32, el receptor de manosa y el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSFR) disminuyen en los macrófagos alveolares con PAP. Los estudios in vitro demuestran que el tratamiento con FEC-GM exógeno aumentaba la expresión del gen PU.1 y M-CSFR en macrófagos alveolares con PAP. Finalmente, los estudios in vivo mostraron que los pacientes con PAP tratados con FEC-GM tienen niveles más altos de expresión de PU.1 y M-CSFR en macrófagos alveolares en relación a pacientes sanos control y pacientes con PAP antes del tratamiento con FEC-GM. Estos resultados sugieren que PU.1 juega un papel crítico en la diferenciación terminal de los macrófagos alveolares humanos.”

**Palabras clave:** PU.1; c-fms; proteinosis alveolar

**Cita en Vancouver:** Tracey L. Bonfield, Baisakhi Raychaudhuri, et al. PU.1 regulation of human alveolar macrophage differentiation requires granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. 2003; 285(5): L1132-L1136 (25)

2. **Autor:** Bhattacharya P, Thiruppathi M, et al.

**Título:** GM-CSF: An Immune Modulatory Cytokine that can Suppress Autoimmunity

**Resumen:** “El factor estimulante de colonias granulocito macrófago (FEC-GM) se identificó originalmente como un factor estimulante de colonias (FEC) debido a su capacidad para inducir poblaciones de granulocitos y macrófagos a partir de células precursoras. Sin embargo, varios estudios han demostrado que el FEC-GM también es una citoquina inmunomoduladora, capaz de afectar no solo el fenotipo de las células del linaje mielóide, sino también la activación de las células T a través de varios intermediarios mieloides. Esta propiedad se ha asociado a la fisiopatología de varias enfermedades autoinmunes, tales como: La artritis y la esclerosis múltiple. En contraste, varios estudios que utilizan modelos animales han demostrado que el FEC-GM tiene la capacidad de suprimir muchas enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Crohn, la diabetes tipo 1, la miastenia gravis y la tiroiditis autoinmune experimental. Los estudios con ratones knockout han sugerido que el papel de FEC-GM en el mantenimiento de poblaciones de granulocitos y macrófagos en el estado de equilibrio fisiológico es en gran medida redundante. En cambio, su papel como inmunomodulador juega un papel importante, ya sea en el desarrollo o la resolución de enfermedades autoinmunes. Esto es posible a través de la diferenciación de las células precursoras en granulocitos, macrófagos y células dendríticas especializadas en estado no estacionario, o mediante la modulación del fenotipo de las células mieloides maduras. Por lo tanto, fuera de la mielopoyesis, el FEC-GM tiene un papel importante en la regulación de la respuesta inmune y en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica.”

**Cita en Vancouver:** Bhattacharya P, Thiruppathi M, et al. GM-CSF: An Immune Modulatory Cytokine that can Suppress Autoimmunity. *Cytokine*. 2015; 75(2):261-271 (26)

3. **Autor:** Tazawa R, Trapnell BC, Inoue Y, et al.

**Título:** Inhaled Granulocyte/Macrophage–Colony Stimulating Factor as Therapy for Pulmonary Alveolar Proteinosis.

**Resumen:** *“Justificación:* El factor estimulante de colonias granulocitos / macrófago (FEC-GM) inhalado es una terapia prometedora para la proteinosis alveolar pulmonar (PAP), pero no se ha estudiado adecuadamente. *Objetivos:* Evaluar la seguridad y la eficacia del FEC-GM inhalado en pacientes con PAP progresiva o continua. *Métodos:* Se realizó un ensayo nacional, multicéntrico, autocontrolado, fase II en nueve “pulmonary centers” en todo Japón. Los pacientes diagnosticados con PAP mediante biopsia de pulmón, hallazgos citológicos, un nivel elevado de anticuerpos anti FEC-GM en suero y un PaO<sub>2</sub> menor de 75 mm Hg fueron observados por un periodo de 12 semanas. Se excluyeron aquellos que mejoraron (es decir, la diferencia de oxígeno alveolar-arterial [A-aDO<sub>2</sub>] disminuyó en 10 mm Hg) durante la observación. El resto ingresó en períodos secuenciales de tratamiento con dosis altas (250 µg los días 1–8, nada los días 9–14; por seis ciclos; 12 semanas); tratamiento con dosis baja (125 µg los días 1–4, nada los días 5–14; por seis ciclos; 12 semanas) y seguimiento (52 semanas). *Mediciones y resultados principales:* 50 pacientes con PAP se inscribieron en el estudio. Durante la observación, nueve mejoraron y dos se retiraron; todos ellos fueron excluidos. De los 35 pacientes que completaron el tratamiento con dosis altas y bajas de FEC-GM; 24 mejoraron, lo que dio como resultado una tasa de respuesta general del 62% (24/39; análisis de intención de tratamiento) y una reducción de A-aDO<sub>2</sub> de 12,3 mm Hg (95% intervalo de confianza, 8.4–16.2; n = 35, P <0.001). No se produjeron eventos adversos graves, y los niveles séricos de autoanticuerpos de FEC-GM se mantuvieron sin cambios. Se produjo una correlación emergente de tratamiento entre A-aDO<sub>2</sub> y la capacidad de difusión del pulmón, y la tomografía computarizada de alta resolución reveló una mejora de la opacidad en vidrio esmerilado. 29 de los 35 pacientes permanecieron estables sin tratamiento adicional durante 1 año. *Conclusiones:* El tratamiento con FEC-GM inhalado es

seguro, eficaz y proporciona un efecto terapéutico sostenido en la PAP autoinmune.”

**Cita en Vancouver:** Tazawa R, Trapnell BC, Inoue Y, et al. Inhaled Granulocyte/Macrophage–Colony Stimulating Factor as Therapy for Pulmonary Alveolar Proteinosis. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2010;181(12):1345-1354. (27)

## Objetivos

### 2.3.1. Objetivo general:

Evaluar el efecto del filgrastim sobre la activación de CD32 y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020.

### 2.3.2. Objetivos específicos:

- Determinar el efecto del filgrastim en la activación de CD32 en macrófagos murinos de tejido pulmonar en el estudio in vivo como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020.
- Determinar el efecto del filgrastim en la activación de M-CSFR en macrófagos murinos de tejido pulmonar en el estudio in vivo como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020.
- Determinar el efecto del filgrastim en la activación de CD32 en macrófagos murinos provenientes de lavado pleural en el estudio in vitro como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020.
- Determinar el efecto del filgrastim en la activación de M-CSFR en macrófagos murinos provenientes de lavado pleural en el estudio in vitro como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020.
- Determinar si la dosis administrada de filgrastim activa la expresión de CD32 y/o M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar – Arequipa, 2020.

**Hipótesis:**

*Nula:* El filgrastim no tiene efecto en la activación de CD32 y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020.

*Alternativa:* El filgrastim tiene efecto en la activación de CD32 y M-CSFR en macrófagos murinos como tratamiento de la proteinosis alveolar pulmonar– Arequipa, 2020.

**3. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL****3.1. Técnicas, instrumentos y materiales de verificación****3.1.1. TÉCNICA:**

Utilizaremos 12 murinos (ratones) que serán comprados del Bioterio de la Universidad Católica de Santa María, cinco formarán parte del trabajo in vivo, que consiste en administrar el fármaco filgrastim a una dosis determinada a cuatro murinos y uno control; luego obtendremos los macrófagos de tejido pulmonar. Y siete formarán parte del trabajo in vitro que consiste en obtener los macrófagos del lavado pleural; para luego cultivarlo y administrar el fármaco filgrastim. Posterior a ello se realizará la extracción del RNA, la transcripción inversa acoplada y amplificación por PCR (RT-PCR) para los genes de CD32, M-CSFR y la electroforesis respectiva.

**3.1.2. INSTRUMENTOS:**

- Micropipeta
- Campana de flujo laminar
- Nanodrop
- Microscopio
- Centrifugadora
- Bortex

- Termociclador

### 3.1.3. MATERIALES:

- Murinos (Ratones)
- Medicamento Filgrastim
- Puntas 1ml
- Jeringas 1,5,10ml
- Tubos eppendorf
- Alcohol
- Algodón
- Papel aluminio
- Hielo
- Suero fisiológico
- Equipo de disección
- Cultivo celular (placa de 06 pozos)
- Medio DEMEN completo
- Antibiótico
- Kit de extracción de RNA
- Kit cDNA
- Kit PCR (Supermix)
- Primers CD32, M-CSFR, beta actina
- Otros (Puntas, jeringas, tubos eppendorf, alcohol, algodón, papel aluminio, micropipetas, gradilla, guantes y otros)
- Materiales de escritorio, computadora con software de procesamientos de texto y estadística, hojas de cálculo, impresora.

## 3.2. Campo de verificación

### 3.2.1. Ubicación espacial

El estudio se realizará en las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María – Arequipa

### 3.2.2. Ubicación temporal

El estudio se desarrollará en el periodo comprendido entre agosto 2018 – febrero 2020.

### 3.2.3. Unidades de estudio

#### 3.2.3.1. Universo: Murinos (Ratones) del Bioterio de la UCSM

##### Criterios de inclusión:

Murinos sanos

Macrófagos provenientes de tejido pulmonar de murinos y lavado pleural.

Murinos con peso entre 40 a 50 gramos

Murinos comprados del Bioterio de la Universidad Católica de Santa María

##### Criterios de exclusión:

Murinos con alguna enfermedad

Macrófagos provenientes de otros órganos o lugares diferentes a los mencionados anteriormente

Murinos con pesos menores a 40 gramos o mayores a 50 gramos

Murinos comprados de proveedores comerciales sin licencia

**3.2.3.2. Tamaño de la Muestra:** 12 ratones

**3.2.3.3. Procedimiento de muestreo:** Extracción de macrófagos

### **3.3. Estrategia de recolección de datos**

#### **3.3.1. Organización**

- Aprobación del proyecto de tesis por médico asesor y médico dictaminador asignado por la Facultad de Medicina de la UCSM, para poder continuar con la ejecución del proyecto.
- Coordinación con la Universidad Católica de Santa María para la compra de los animales de laboratorio (ratones) y permiso para poder llevar a cabo el trabajo en el Bioterio y Laboratorio de la universidad.
- Se solicitará permiso al comité de ética para poder trabajar con animales de laboratorio (ratones).
- Se realizará la compra del material necesario (primers, medicamentos, kit cDNA, kit PCR y otros) para la ejecución del proyecto en el laboratorio.
- Se realizará estudios piloto antes de la ejecución del proyecto con murinos en el laboratorio de la universidad.
- Se realizará la extracción de macrófagos murinos, para luego realizar la transcripción inversa acoplada y amplificación por PCR (RT-PCR) para los genes de CD32, M-CSFR y la electroforesis respectiva en el laboratorio.

- Organización de los datos obtenidos en laboratorio y procesamiento de datos en hojas de cálculo para su posterior análisis estadístico e interpretación.

### 3.3.2. Recursos

#### 3.3.2.1. Humanos

- Investigadora: Yulisa Lope Choque
- Asesor: Dr. Jesús Salinas Gamero
- Personal especialista en laboratorio

#### 3.3.2.2. Financieros:

- El dinero proviene del Concurso ganado en la Jornada Santamariana 2018 y de la investigadora

#### 3.3.2.3. Materiales

- Murinos (Ratones)
- Kit para RT-PCR
- Medicamento: Filgrastim
- Materiales de laboratorio

### 3.3.3. Criterios o estrategia para el manejo de resultados

#### a) Plan de Procesamiento:

Los datos serán obtenidos a partir de los resultados obtenidos en el laboratorio, los cuales serán codificados y tabulados.

#### b) Plan de Clasificación:

Se clasificarán los datos en el programa Microsoft Excel 2016 para la adecuada organización de la información.

c) Plan de Conteo:

Dado que los datos se encontrarán ingresados en un sistema electrónico, el conteo se llevará a cabo mediante funciones predeterminadas en las hojas de cálculo de Microsoft Excel 2016 y el programa estadístico SPSS v11.

d) Plan de Análisis:

La estadística descriptiva se realizará por medio de frecuencias y porcentajes (medias y desviaciones estándar para las variables numéricas). La prueba estadística utilizada será una prueba no paramétrica (Prueba de Friedman).

Se tomará como significativo un valor de  $p < 0,05$ .

#### 4. CRONOGRAMA DE TRABAJO:

Tiempo en meses  Actividades	Año								
	2018	2019				2020			
	Agosto a diciembre	Enero a abril	Mayo a julio	Agosto a	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	
1. Elección del tema									
2. Revisión bibliográfica									
3. Sistematización de bibliografía									
4. Redacción del proyecto									
5. Aprobación proyecto de tesis profesores de curso taller de tesis									
6. Aprobación del proyecto de tesis por asesor									
7. Dictamen de comité de ética de investigación									
8. Ejecución del proyecto									
9. Análisis e interpretación									
10. Informe final									

Fecha de inicio: Agosto 2018

Fecha probable de término: Marzo 2020

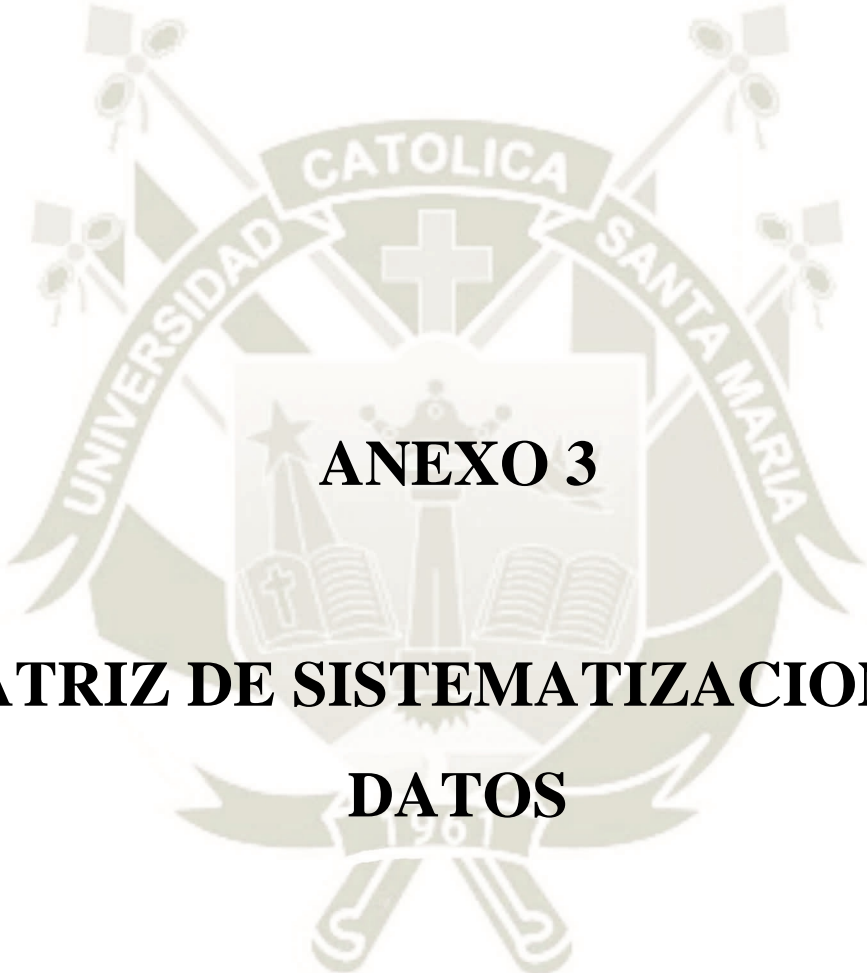
## 5. BIBLIOGRAFÍA BÁSICA:

1. Takuji Suzuki, T, Bruce C. Trapnell, B. Pulmonary alveolar proteinosis Syndrome. *Clinics in Chest Medicine*. 2016; 37(3): 431-440.
2. Carey B, Trapnell BC. The molecular basis of pulmonary alveolar proteinosis. *Clin Immunol*. 2010;135(2):223-235.
3. Inoue, Y., Trapnell, B. C., Tazawa, R., Arai, T., Takada, T., Hizawa, N., ... Japanese Center of the Rare Lung Diseases Consortium (2008). Characteristics of a large cohort of patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis in Japan. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 177(7), 752–762. doi:10.1164/rccm.200708-1271OC
4. Patel SM, Sekiguchi H, Reynolds JP, Krowka MJ. Pulmonary alveolar proteinosis. *Can Respir J*. 2012;19(4):243-245.
5. Juvet SC, Hwang D, Waddell TK, Downey GP. Rare lung disease II: Pulmonary alveolar proteinosis. *Can Respir J*. 2008;15(4):203-210.
6. Sheng G, Chen P, Wei Y, Chu J, Cao X, Zhang HL. Better approach for autoimmune pulmonary alveolar proteinosis treatment: inhaled or subcutaneous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: a meta analyses. *Respir Res*. 2018;19(1):163.
7. Seymour JF, Presneill JJ. Pulmonary alveolar proteinosis: progress in the first 44 years. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166(2):215-35.
8. Xu Z, Jing J, Wang H, Xu F, Wang J. Pulmonary alveolar proteinosis in China: a systematic review of 241 cases. *Respirology*. 2009; 14(5):761-766.
9. Inoue Y, Trapnell BC, Tazawa R, et al. Characteristics of a Large Cohort of Patients with Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis in Japan. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2008; 177(7):752-762.
10. Presneill JJ, Nakata K, Inoue Y, Seymour JF. Pulmonary alveolar proteinosis. *Clin Chest Med*. 2004; 25(3):593-613
11. Bonella Francesco, F, Peter C. Bauer, P, et al. Pulmonary alveolar proteinosis: New insights from a single-center cohort of 70 patients, *Respiratory Medicine*. 2011, 105(12): 1908-1916

12. Suzuki T, Sakagami T, Young LR, et al. Hereditary Pulmonary Alveolar Proteinosis: Pathogenesis, Presentation, Diagnosis, and Therapy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2010; 182(10):1292-1304.
13. Campo I, Mariani F, Rodi G, et al. Assessment and management of pulmonary alveolar proteinosis in a reference center. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2013; 40(8).
14. Beccaria M, Luisetti M, et al. Long-term durable benefit after whole lung lavage in pulmonary alveolar proteinosis. *European Respiratory Journal* 2004 23: 526-531
15. Turkistany, S.A., DeKoter, R.P. The Transcription Factor PU.1 is a Critical Regulator of Cellular Communication in the Immune System. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 59, 431–440 (2011) doi:10.1007/s00005-011-0147-9
16. Xu Z, Jing J, Wang H, Xu F, Wang J. Pulmonary alveolar proteinosis in China: a systematic review of 241 cases. *Respirology*. 2009; 14(5):761-756.
17. Seymour JF, Dunn AR, Vincent JM, Presneill JJ, Pain MC. Efficacy of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in acquired alveolar proteinosis. *N Engl J Med*. 1996; 335(25):1924-1925.
18. Tazawa R, Hamano E, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and lung immunity in pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171(10):1142-1149.
19. Tazawa R, Hamano E, Arai T, et al. Granulocyte-Macrophage Colony–Stimulating Factor and Lung Immunity in Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171 (10): 1142-1149.
20. James E. Frampton, C. Rhoda Lee and Diana Faulds Filgrastim A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Efficacy in Neutropenia. 1994; 48 (5): 731.
21. Ramirez J., Kieffer R.F., Ball W.C. Bronchopulmonary lavage in man. *Ann. Intern. Med*. 1965;63(5):819–828.
22. Gajewska ME, Sritharan SS, Santoni-Rugiu E, Bendstrup EM. Autoimmune pulmonary alveolar proteinosis in an adolescent successfully treated with inhaled rhGM-CSF (molgramostim). *Respiratory Medicine Case Reports*. 2018; 23:167-169.

23. Fda, F. Leukine (sargramostim) A Recombinant GM-CSF–Yeast-Expressed. [Online]. Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/103362s52371bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/103362s52371bl.pdf) [Accessed 20 October 2018].
24. Fda. F. NEUPOGEN® (Filgrastim) Amgen Manufacturing, Limited, a subsidiary of Amgen Inc. [Online]. Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2012/103353s51471bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/103353s51471bl.pdf) [Accessed 20 October 2018].
25. Tracey L. Bonfield, Baisakhi Raychaudhuri, et al. PU.1 regulation of human alveolar macrophage differentiation requires granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. 2003; 285(5): L1132-L1136
26. Bhattacharya P, Thiruppathi M, et al. GM-CSF: An Immune Modulatory Cytokine that can Suppress Autoimmunity. Cytokine. 2015; 75(2):261-271.
27. Tazawa R, Trapnell BC, Inoue Y, et al. Inhaled Granulocyte/Macrophage–Colony Stimulating Factor as Therapy for Pulmonary Alveolar Proteinosis. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2010;181(12):1345-1354.
28. Bonfield TL, Kavuru MS, and Thomassen MJ. Anti-GM-CSF titer predicts response to GM-CSF therapy in pulmonary alveolar proteinosis. Clin Immunol 105: 342–350, 2002.
29. Zhang, F., Weng, D., Su, Y., Yin, C., Shen, L., Zhang, Y., ... Li, H. Therapeutic effect of subcutaneous injection of low dose recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on pulmonary alveolar proteinosis. *Respiratory research*, 2020. 21(1), 1. doi:10.1186/s12931-019-1261-1
30. McCarthy, C., Lee, E., Bridges, J. P., Sallese, A., Suzuki, T., Woods, J. C., Trapnell, B. C. Statin as a novel pharmacotherapy of pulmonary alveolar proteinosis. *Nature communications*, 2018. 9(1), 3127. doi:10.1038/s41467-018-05491-z
31. Ishii, H., Seymour, J. F., Tazawa, R., Inoue, Y., Uchida, N., Nishida, A., ... Nakata, K. Secondary pulmonary alveolar proteinosis complicating myelodysplastic syndrome results in worsening of prognosis: a retrospective cohort study in Japan. *BMC pulmonary medicine*, 2014.14, 37. doi:10.1186/1471-2466-14-37

32. Trapnell, Nakata, Bonella, Campo, Griese, Hamilton, Tisha Wang, Morgan, Cottin and Cormac McCarthy. Pulmonary alveolar proteinosis. *Nat Rev Dis Primers* 2019. 5, 16 doi:10.1038/s41572-019-0066-3
33. UpToDate. Sargramostim: Drug information. [https://www.uptodate.com/contents/sargramostim-drug-information?search=sargramostim&source=panel\\_search\\_result&selectedTitle=1~25&usage\\_type=panel&kp\\_tab=drug\\_general&display\\_rank=1#F220000](https://www.uptodate.com/contents/sargramostim-drug-information?search=sargramostim&source=panel_search_result&selectedTitle=1~25&usage_type=panel&kp_tab=drug_general&display_rank=1#F220000) (accessed 10 january 2020)
34. UpToDate. Filgrastim (including biosimilars of filgrastim): Drug information. [https://www.uptodate.com/contents/filgrastim-including-biosimilars-of-filgrastim-drug-information?search=filgrastim&source=panel\\_search\\_result&selectedTitle=1~148&usage\\_type=panel&kp\\_tab=drug\\_general&display\\_rank=1#F171247](https://www.uptodate.com/contents/filgrastim-including-biosimilars-of-filgrastim-drug-information?search=filgrastim&source=panel_search_result&selectedTitle=1~148&usage_type=panel&kp_tab=drug_general&display_rank=1#F171247) (accessed 10 january 2020)
35. Anania JC, Chenoweth AM, Wines BD and Hogarth PM The Human FcγRII (CD32) Family of Leukocyte FcR in Health and Disease. *Front. Immunol.* 2019 10:464. doi: 10.3389/fimmu.2019.00464
36. John Adams Fischer, Stefano Rossetti, Nicoletta Sacchi. CSF1R (colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.* 2008(04). Revista de internet). (Citado el 10 enero 2020). En: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/CSF1RID40161ch5q32.html>



**ANEXO 3**

**MATRIZ DE SISTEMATIZACION DE  
DATOS**

ACTINA	RNA (ng/ul)	Absorbancia	Abs x 20ul
Blanco	446.8	11.38	227.6
Tejido pulmonar control	457.55	10.54	210.8
Tejido pulmonar 1º dia tratamiento	468.1	10.96	219.2
Tejido pulmonar 2º dia tratamiento	497.8	11.57	231.4
Lavado pleural 1	592.45	17.68	353.6
Lavado pleural 2	601.65	14.04	280.8
<b>CD32</b>			
Blanco	667.55	15.58	311.6
Tejido pulmonar control	639.7	15.47	309.4
Tejido pulmonar 1º dia tratamiento	692.7	14.02	280.4
Tejido pulmonar 2º dia tratamiento	606.5	14.27	285.4
Lavado pleural 1	603.4	14.16	283.2
Lavado pleural 2	611.65	14.55	291
<b>M-CSFR</b>			
Blanco	509.4	0	0
Tejido pulmonar control	634.55	15.08	301.6
Tejido pulmonar 1º dia tratamiento	575	14.63	292.6
Tejido pulmonar 2º dia tratamiento	587.7	14.11	282.2
Lavado pleural 1	601.55	14.22	284.4
Lavado pleural 2	631.05	15.11	302.2
NOTA	BLANCO	IN VIVO	
	NARANJA	IN VITRO	





## ANEXO 4

# ORDEN DE USO DE BIOTERIO



Universidad Católica  
de Santa María

☎ (51 54) 282036    🌐 <http://www.ucsm.edu.pe>    📘 [facebook.com/ucsm.edu.pe/](https://www.facebook.com/ucsm.edu.pe/)

## ORDEN DE USO DE BIOTERIO

UCSM-COORD. LAB. N° : 003-Coord.Lab.2020

EXPEDIENTE N° : 202000002718

**LOPE CHOQUE YULISA YASMINA**

---

Arequipa, 2020 Enero, 28

Pase al Asistente de Bioterio:

*Yulisa Yasmina Lope Choque*

Se autoriza el uso del Bioterio, y compra de animales de experimentación (12 RATONES) para que la señorita en mención tesista desarrolle su proyecto de investigación "EFECTO DEL FILGRASTIM Y SARGRAMOSTIM SOBRE LA ACTIVACION DE PU.1, CD32, M-CSFR ASOCIADO A PROTEINOSIS ALVEOLAR PULMONAR EN MACROFAGOS MURINOS – AREQUIPA 2020" previa coordinación de horario.

Cantidad de animales : 12 ratones

Fecha de Inicio : 17-02-2020

Fecha de término : 18-02-2020

Atentamente,

*Jesús María Cambano Salas de Calle*  
D<sup>o</sup> JESÚS MARÍA CAMBANO SALAS DE CALLE  
COORDINADORA DE LABORATORIOS  
Y GABINETES  
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INSCRIBIDA  
D<sup>o</sup>