

11220
5



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES "DR. BERNARDO SEPULVEDA G."
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

**EVALUACION DEL PERFIL INMUNOLOGICO
HUMORAL DE PACIENTES ASMATICOS ALERGICOS A
ACAROS (*Dermatophagoides pteronyssinus* y *D. farinae*) Y SU
RELACION CON LOS DIFERENTES GRADOS DE
SEVERIDAD SEGUN GINA (Global Initiative for asthma)
Y PRUEBAS DE FUNCION RESPIRATORIA.**

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
**SUBESPECIALIDAD EN ALERGIA E
INMUNOLOGIA CLINICA**
P R E S E N T A
DR. MANUEL BENJAMIN ESPINOZA GOLDMAN

TUTOR: DRA. NORA H. SEGURA M.
ASESORES: M. EN C. MARIA DEL CARMEN MALDONADO B.
DR. ARMANDO ISIBASI A.
M.C. MARIA LUISA CUEVAS U.



MEXICO, D. F.

AGOSTO DE 2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DR. BERNARDO SEPÚLVEDA G.
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
SERVICIO DE ALERGIA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA**

**EVALUACIÓN DEL PERFIL INMUNOLÓGICO HUMORAL DE PACIENTES ASMÁTICOS
ALÉRGICOS A ÁCAROS (*Dermatophagoides pteronyssinus* y *D. farinae*) Y SU
RELACIÓN CON LOS DIFERENTES GRADOS DE SEVERIDAD SEGÚN GINA (Global
Initiative for Asthma) Y PRUEBAS DE FUNCIÓN RESPIRATORIA**

Autor

DR. MANUEL BENJAMÍN ESPINOZA GOLDMAN *

Tutor

DRA. NORA HILDA SEGURA MÉNDEZ **

Asesores

**M. en C. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL¹
DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO²**

Asesor Metodológico

M. C. MARÍA LUISA CUEVAS URIÓSTEGUI³

* Médico Residente del Servicio de Alergia e Inmunología Clínica H. E. CMN. Siglo XXI

** Médico Base del Servicio de Alergia e Inmunología Clínica H. E. CMN. Siglo XXI

¹ U. I. M. en Inmunoquímica del H. E. CMN. Siglo XXI

² Jefe de la U.I.M. en Inmunoquímica del H. E. CMN Siglo XXI

³ Asesora en Estadística Aplicada a la Salud de la U. I. M. E. C. de la coord. de Investigación en Salud, IMSS


EVALUACIÓN DEL PERFIL INMUNOLÓGICO HUMORAL DE PACIENTES ASMÁTICOS ALÉRGICOS A ÁCAROS (*Dermatophagoides pteronyssinus* y *D. farinae*) Y SU RELACIÓN CON LOS DIFERENTES GRADOS DE SEVERIDAD SEGÚN GINA (Global Initiative for Asthma) Y PRUEBAS DE FUNCIÓN RESPIRATORIA
PROTOCOLO NÚMERO 066/2001

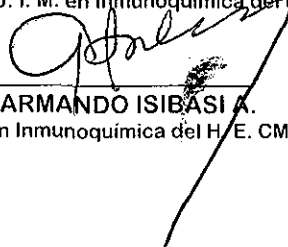
TUTOR DE TESIS


DRA. NORA H. SEGURA M.

Médico Base del Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del H. E. CMN Siglo XXI

ASESORES


M. en C. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL
Maestra en Ciencias de la U. I. M. en Inmunología del H. E. CMN Siglo XXI

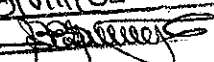

DR. ARMANDO ISIBASI A.
Jefe de la U. I. M. en Inmunología del H. E. CMN Siglo XXI



ASESOR METODOLÓGICO


M. C. MARÍA LUISA CUEVAS URIOSTEGUI A. M.
DIVISION DE ESPECIALIZACION
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA

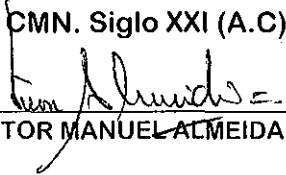
Asesora en Estadística Aplicada a la Salud de la U. I. M. E. C de la Coordinación de Investigación en Salud, IMSS

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepción.
NOMBRE: Manuel Benjamín
Galindo Goldman
FECHA: 28/VIII/02
FIRMA: 

JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN MÉDICA


DR. JOSÉ HALABE CHEREM

JEFE DEL SERVICIO DE ALERGI A E INMUNOLOGÍA CLÍNICA DEL H. E.
CMN. Siglo XXI (A.C)


DR. VÍCTOR MANUEL ALMEIDA ARVIZU



DEDICATORIAS

A DIOS:

*Por haberme ofrecido la oportunidad de la vida, la salud y todos los dones de los que he gozado a lo largo de estos años. Por haberme dado los padres y la familia que me dio, por haberme brindado las oportunidades de conocer a tanta gente y lugares.
Por permitirme vivir una vida llena de alegrías. Gracias.*

A MIS PADRES:

Por servirme de apoyo cada vez que necesité de una palabra de aliento, por creer en mí y alentarme cada día de mi vida. Por todos los sacrificios que han tenido que hacer a lo largo de todos estos años para que yo pudiera alcanzar esta meta. Un millón de gracias - LOS AMO.

*A ESA PERSONA QUE ME COSTÓ TANTO ENCONTRAR,
A ESA PERSONA QUE SIN SU AMOR Y PACIENCIA NO HABRÍA PODIDO CONCLUIR
A ESA PERSONA QUE ME OFRECIÓ SU VIDA DE FORMA INCONDICIONAL
A ESA PERSONA A LA QUE ME DEBO POR COMPLETO
A MI VIDA - **NORA ELENA***

A MI ADORADA HIJA:

Por ser parte de todo, inspiración e infusión de anhelos.

A MIS DOS HERMANOS:

Porque creyeron en mí y siempre recibí de ellos palabras de aliento.

AGRADECIMIENTOS

1. A la Dra. Nora H. Segura M. por sus consejos durante la realización de este trabajo.
2. A los médicos de base del Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del H.E. CMN. Siglo XXI.
3. Al personal de enfermería, del cual solo recibí apoyo a lo largo de estos dos años.
4. En especial al Fondo para el Fomento de la Investigación (FOFOI), que sin su patrocinio jamás se hubiese podido realizar este proyecto (168/2001).
5. A la Caja del Seguro Social de Panamá por quienes estoy en este país becado. Esperando poder retribuir, lo invertido en mí, sobre los pacientes a quienes me debo.
6. A la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica y a todos sus integrantes por su participación y comentarios que me fueron de gran utilidad.
7. Al Maestro en Ciencias Rafael Mondragón y al Servicio de Dermatología quienes me apoyaron muy amablemente con el reactivo para realizar la determinación del IFN- γ .
8. A mis compañeros de la residencia de Alergia e Inmunología Clínica quienes de una u otra forma me ayudaron en la captación de los pacientes.
9. Al Doctor Jaime Mejía Ortega por la donación del Kit con el que se practicaron las pruebas cutáneas y por su apoyo durante estos dos años.
10. A todo el personal de la Clínica 28, en especial al Dr. Augusto B. Torres Salazar Jefe de Enseñanza de la Clínica por su apoyo y muy en especial a los residentes que participaron como voluntarios, sin su colaboración este trabajo no se hubiese podido completar.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	01
A. PREVALENCIA.....	01
B. ETIOLOGÍA.....	02
i) GENÉTICA.....	03
ii) MEDIO AMBIENTE.....	04
iii) EVENTOS GESTACIONALES.....	05
iv) INFECCIONES RESPIRATORIAS.....	06
C. PATOGÉNESIS.....	07
i) INTERLEUCINA-4 (IL-4).....	11
ii) INTERLEUCINA-13 (IL-13).....	12
iii) INTERLEUCINA-10 (IL-10).....	13
iv) INTERLEUCINA-12 (IL-12).....	13
v) INTERFERÓN- γ (IFN- γ).....	14
vi) FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α (TNF- α).....	14
vii) INMUNOGLOBULINA E (IgE).....	15
D. DIAGNÓSTICO DE ASMA.....	16
i) PRUEBAS DE FUNCIÓN PULMONAR.....	16
ii) GUÍA GINA PARA EL DIAGNÓSTICO DE ASMA.....	17
iii) PRUEBAS CUTÁNEAS.....	18
iv) ALERGENOS.....	19
JUSTIFICACIÓN.....	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24

OBJETIVOS.....	26
HIPÓTESIS.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
A. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	28
B. UNIVERSO DEL TRABAJO.....	28
C. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES.....	29
i) VARIABLES INDEPENDIENTES.....	29
ii) VARIABLES DEPENDIENTES.....	29
iii) VARIABLES UNIVERSALES.....	29
iv) VARIABLES DE CONFUSIÓN.....	29
D. DEFINICIÓN OPERATIVA DE LAS VARIABLES.....	29
E. SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	33
i) TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	33
ii) CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	33
(1) CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	33
(2) CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	34
(3) CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN.....	34
F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	34
G. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	35
H. RECURSOS PARA EL ESTUDIO.....	35
PROCEDIMIENTO.....	36
RESULTADOS.....	39
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES.....	56
TABLAS.....	56

CUADROS.....	57
GRÁFICOS.....	59
FIGURAS.....	60
BIBLIOGRAFÍA.....	78
ANEXOS.....	93

INTRODUCCIÓN

El asma es un síndrome clínico complejo, caracterizado por una obstrucción variable y reversible de la vía aérea, hiperreactividad bronquial persistente, edema de la vía e inflamación caracterizada por un infiltrado de células cebadas, linfocitos y eosinófilos predominantemente, que se acompaña de un proceso de remodelación pulmonar¹⁻⁷.

Desde finales de los años 60, necropsias practicadas en pacientes que habían muerto durante una crisis asmática, mostraban un cuadro histopatológico clásico, donde predomina un infiltrado celular inflamatorio, compuesto principalmente por eosinófilos, edema de la submucosa, descamamiento epitelial, tapones de moco en la luz de los bronquios, hipertrofia del músculo liso e hiperplasia de las glándulas mucosas. En la actualidad se sabe que el asma es consecuencia directa de la inflamación submucosa y de la hiperreactividad asociada del músculo liso de la vía aérea. La inflamación puede precipitarse por exposición a alérgenos, ciertos esfuerzos, agentes químicos y otros agentes no identificados¹⁻⁸.

PREVALENCIA

En las dos últimas décadas se ha estudiado la prevalencia del asma en varios países⁹⁻¹⁰, demostrándose que ha existido un aumento real en la prevalencia, tanto de las enfermedades alérgicas como del asma en niños y adultos¹¹. Un estimado de 15 millones de norteamericanos se encuentran afectados por estas condiciones. Estudios en algunas

ciudades de los Estados Unidos de Norteamérica presentan cifras de prevalencia que oscilan entre 6.4 a 10.8% en niños de 7 a 8 años. El análisis de los datos de The National Health Interview Survey reveló que en Estados Unidos, entre 1981 y 1988, la prevalencia de asma informada por los padres de familia tuvo un incremento del 42% en todos los niños menores de 18 años¹². Por otro lado, desde el punto de vista epidemiológico, se ha observado una ligera diferencia con relación al sexo y a la raza: afecta en mayor proporción al sexo femenino y a los de raza negra en el adulto joven¹³.

En nuestro país el asma ocupó en 1988 el decimoprimer lugar como causa de mortalidad general. El Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) tiene como grupos de mayor riesgo a los niños, adolescentes y jóvenes entre los 30 y 40 años de edad¹⁴.

Estudios realizados en México reportan que la prevalencia de asma en 1948 era de 1.2% y en 1960 del 2%. En 1991, un estudio realizado por el Dr. Pedroza estimó la prevalencia del asma en 11.8% en la ciudad de México D.F.²². Los datos sobre la prevalencia del asma varían de 2.7 a 21.8%, según estudios hechos en otras ciudades de México, variando de forma importante de una región a otra¹⁵⁻¹⁸.

ETIOLOGÍA

La etiología del asma es compleja y multifactorial. Involucra la interacción de factores genéticos y estímulos ambientales. La mayoría de la información con respecto a la patogénesis del asma se concentra en el asma atópica y el desbalance existente entre los

fenotipos Th1 (inmunidad celular) y Th2 (inmunidad humoral)^{1,7,19-27}. Sin embargo, también puede existir un tipo de asma no alérgica caracterizada por pruebas cutáneas a alérgenos negativas y sin historia de enfermedad atópica en la familia. La genética, el medio ambiente uterino, la dieta materno-fetal, infecciones respiratorias y la exposición ambiental y ocupacional contribuyen a este delicado balance. La forma con la cual estos factores convergen determinará si la reacción del sistema inmune de un individuo particular provocará inflamación de la vía aérea y remodelación.

Genética

El asma es un síndrome para el cual la predisposición genética es fundamental, pero poco entendida. En la actualidad no existe duda sobre el papel que juega la herencia en la etiología del asma y de su estrecha interacción con el medio ambiente. Análisis extensos de segregación, en cohortes aleatorizadas de familias, utilizando las múltiples características del asma (IgE, hiperreactividad bronquial, atopia, sibilancias) han demostrado que estas características son *poligénicas y multifactoriales*³⁰⁻³⁴. Algunos de los genes identificados son: 5q31-32 (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-12, IL-13 etc), 6p21-22 (complejo HLA y TNF- α), 11q13, 11q15, 12q, 13q, 14q, 16p etc¹. A pesar de existir evidencia que relaciona estas características a más de 22 loci de 15 cromosomas autosómicos y de la región pseudoautosómica Xq/Yq, a la fecha no se ha podido distinguir a un gen principal³⁵. La expresión de la enfermedad dependerá de la interacción entre los múltiples genes mayores y menores y su modulación con factores no genéticos, como el medio ambiente^{37,38}.

Medio ambiente

El enorme incremento de la prevalencia del asma en los últimos 20 años, muestra el importante papel que juega el medio ambiente en el desarrollo y evolución de esta enfermedad. Podemos dividir la influencia del medio ambiente en dos categorías: protectora y causal³⁹⁻⁴⁰.

Influencia Protectora:

- Dieta: especialmente el aceite de pescado, vegetales, frutas, antioxidantes, una dieta materna adecuada durante el embarazo y la leche materna⁴⁰.
- Exposición microbiana: flora intestinal⁴¹⁻⁴³ y animales de granja⁴⁰.
- Familias grandes⁴¹.
- Factores socio-económicos: bajo ingreso y hacinamiento^{1,39,40}.
- Infecciones: tuberculosis e infecciones virales en la infancia temprana⁴²⁻⁵⁰.

Influencia causal:

- Humo del tabaco: ambiental (prenatal y durante la niñez e infancia temprana) y el fumado activo en la infancia tardía y adultos jóvenes^{40,41}.
- Factores socio económicos: alto nivel económico (habitan hogares aislados, sin buena ventilación, con calefacción o sistemas de aire acondicionados centrales, alfombras etc)⁴¹.
- Exposición a alérgenos⁵¹⁻⁵⁶: ácaros del polvo del hogar, cucarachas⁵⁴, gatos⁴⁸, perros, ratas, ratones, algunos alimentos etc.
- Dieta: especialmente ácidos grasos saturados (sobretudo durante el embarazo), ablactación temprana.
- Exposición a hongos y mohos⁵⁷.

- Habitar casa húmedas.
- Contaminación ambiental (partículas de diesel, SO₂, NO₃ etc.)⁵⁸⁻⁶¹.
- Exposición ocupacional (isocianatos etc).
- Familias pequeñas

Otros factores que pueden influir y potenciar el padecimiento:

- Vacunación⁶²
- Ejercicio
- Clima (liberación de pólenes después de una tormenta)⁵⁸.
- Parasitosis⁶³

Eventos gestacionales

Está claro, en la actualidad, que factores que afectan el periodo gestacional juegan un papel clave en el desarrollo del tipo de respuesta inmune que desarrollará el feto. Existe una interacción entre las características genética heredadas tanto de la madre como del padre y el ambiente *in utero* creado por la madre. La presencia de anticuerpos IgG e IgE maternos puede influir en el tipo de respuesta inmune iniciada por el feto contra antígenos presentes en el líquido amniótico y en el plasma materno. Normalmente existe una interrelación compleja entre la producción de citocinas fetales, maternas y placentarias, la cual previene el rechazo del feto, pero que, si presenta un desbalance, resultará en una respuesta tipo Th-2 persistente, en lugar de la respuesta transitoria que normalmente existe en todos los recién nacidos al momento del nacimiento. En las madres con enfermedad atópica, este efecto transitorio puede estar exagerado. Si no ocurren

estímulos que restauren el balance Th-1/Th-2 de la respuesta inmune, el niño puede tener predisposición a atopia y asma^{1,64,65}.

Infecciones respiratorias

Una de las mayores influencias en el balance Th-1/Th-2 es la exposición a agentes infecciosos⁴³⁻⁵⁰. Enfermedades como la hepatitis A, el sarampión⁴⁸ y la tuberculosis se han asociado con una disminución en la tasa de atopia. Mientras que el virus sincicial respiratorio y otros que causan infecciones de la vía aérea respiratoria inferior causan un aumento en la tasa de sibilancias, atopia y asma. Aunque algunos virus pueden dejar secuelas que mimetizan al asma, hoy en día existe una fuerte evidencia de que las infecciones en la infancia protegen en contra del desarrollo del asma. Un ejemplo del efecto protector de las infecciones lo podemos ver en poblaciones con estilos de vida antroposófica (poblaciones que restringen el uso de medicamentos, no se vacunan y no utilizan antipiréticos) en donde el diagnóstico de asma era un 50% menor que en las poblaciones control. La vacunación, los antibióticos que cambian y disminuyen la flora normal del intestino, reducen la exposición a estímulos infecciosos que promueven un tipo de respuesta Th-1. De estas evidencias nace la "hipótesis de higiene", la que sugiere que al momento del nacimiento el sistema inmune se encuentra desviado hacia una respuesta inmune tipo Th-2. A medida que el niño sucesivamente se expone a infecciones, a antígenos ambientales y endógenos su sistema inmune regresa al balance Th-1/Th-2^{40,68}.

PATOGÉNESIS

La inflamación alérgica involucra una compleja interacción entre muchas diferentes células inflamatorias que liberan un amplio espectro de mediadores químicos, afectando varios tejidos blanco. Aunque las manifestaciones clínicas de la respuesta alérgica varían dependiendo del tejido y el antígeno involucrado, en la actualidad se sabe que la reacción consiste de:

- a-) Una fase temprana (inmediata) dependiente de la degranulación de las células cebadas, donde se libera principalmente histamina y otros mediadores que incluyen citocinas, prostaglandinas, leucotrienos, triptasa, quimasa; esta fase aparece a los pocos minutos de la exposición del sujeto a un antígeno y usualmente finaliza a las 2 horas y de
- b-) Una fase tardía que se caracteriza por la migración de células inflamatorias desde la circulación^{2,6}. Esta fase inicia a las 3 horas de la exposición al alérgeno aproximadamente y puede persistir desde 24 horas hasta semanas y está asociada a un aumento en la inflamación eosinofílica de la vía aérea e hiperreactividad.

La fase de sensibilización de la respuesta alérgica empieza cuando las células profesionales presentadoras de antígenos exponen fragmentos del alérgeno a los linfocitos T. En un proceso que involucra la secreción de IL-4 por parte de los linfocitos T, los linfocitos B son activados y maduran a células plasmáticas que producen anticuerpos IgE antígeno-específicos. La IgE se une a sus receptores en las células cebadas y basófilos circulantes. En una exposición subsecuente con el alérgeno, este último se une

al anticuerpo IgE, provocando el entrecruzamiento de las moléculas de IgE y la activación de una cascada de enzimas en la membrana celular que involucra a la tirosina cinasa, protein cinasa C, fosfolipasa C, fosfolipasa A2 y la entrada de iones de calcio; lo que provoca la liberación de mediadores químicos preformados (histamina) y de mediadores recién formados (prostaglandinas y leucotrienos) durante la fase temprana.

Las células cebadas también secretan interleucinas y otras citocinas que regulan la duración y la intensidad de la respuesta inmune, al promover la expresión de moléculas de adhesión y reclutar células inflamatorias, particularmente eosinófilos, al sitio de la reacción alérgica. Estas células inflamatorias liberan mediadores inflamatorios adicionales en la fase tardía, llevándonos a una inflamación crónica, reproducción y daño de los tejidos⁷¹.

Han existido dos etapas principales en la historia de la patogénesis de la alergia atópica. La primera etapa inicia con el descubrimiento en 1979, por Ehrlich, de las células cebadas y los eosinófilos, seguido por la identificación de las "reaginas" por Prausnitz y Kustner en 1921. Este período finaliza con el descubrimiento de la IgE, por los esposos Ishizaka y por Johansson de forma separada. El concepto de la reacción alérgica para ese entonces, era el de una reacción inflamatoria producto de la interacción de un alérgeno ambiental con un anticuerpo IgE específico unido a un receptor IgE y la consecuente liberación de mediadores inflamatorios por las células cebadas^{2,22}.

La segunda etapa inicia en 1986 con el descubrimiento en modelos murinos, por Coffman y Carty, de las citocinas que regulan la producción de IgE por parte de las células B y en

los humanos por Del Prete y col., seguido por la descripción, en ratones, de las células tipo Th1 y Th2 por Mossmann y col., y su descripción en humanos que fue realizada también por Prete y col.. Esta fase todavía continúa²².

A través de los años las citocinas han recibido diferentes nombres: linfocinas, monocinas, quimiocinas, interferones, factores estimulantes de colonias y factores de crecimiento. Todos estos nombres se combinan en una nueva nomenclatura "interleucinas". La interleucinas o citocinas son usualmente polipéptidos o glicoproteínas con un peso molecular de 30 kDa o menos. Algunas características comunes de las citocinas permiten que se agrupen en familias. Estas citocinas tienen receptores que se pueden agrupar en familias⁷².

Las citocinas son los principales directores en los procesos de defensa del hospedero y están involucradas en las respuestas a insultos, tanto de tipo exógeno como endógeno, en la reparación y restauración de la homeostasis de los tejidos. Una citocina en particular, usualmente es producida y secretada por varios tipos de células, mientras que diferentes citocinas frecuentemente tienen funciones que se traslapan (redundancia). Características comunes en las citocinas son sus múltiples acciones en diferentes blancos celulares (pleiotrópicas), en un pequeño radio de acción, ya sea sobre la misma célula que la produjo (autocrina) o en otras células a su alrededor (paracrina), al ser secretadas en enormes cantidades pueden afectar células blancas alejadas del sitio de producción (endocrina). Además de esta regulación positiva, la IL-4 activa a las células Th2 para producir más IL-4, las citocinas también pueden provocar una regulación negativa en las

células Th1, por ejemplo: la IL-4 inhibe la producción de citocinas tipo Th1 como el IFN- γ ⁷².

En la actualidad, se caracteriza a la alergia, como una reacción resultado de una respuesta celular de tipo Th2 a uno o más alérgenos del medio ambiente^{21,25-29,51-62,73-75}. Esta respuesta tipo Th2 específica, representa el inicio de un grupo de eventos caracterizados por el reclutamiento y participación de otros tipos de células⁷⁶⁻⁸⁷, al igual que el de un gran número de factores solubles y moléculas de adhesión⁸⁵; dando como resultado una cascada inflamatoria de inigualable complejidad.

Estas células Th2 representan una forma polarizada de la respuesta inmune mediada por células T cooperadora, caracterizándose por la producción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-25. En contraste la otra forma polarizada de respuesta mediada por células T cooperadora, que es llamada tipo Th1, se caracteriza por la producción de IL-2, IL-12, INF- γ , TNF- α , IL-18²⁸. Esta polarización hacia uno u otro tipo de respuesta se observa muy claramente en los modelos murinos y con mucha menor claridad en los seres humanos^{73,88}.

La respuesta del tipo Th1 es altamente protectora contra infecciones para una gran cantidad de microorganismos, especialmente contra parásitos intracelulares, gracias a su habilidad para activar macrófagos y promover la producción de anticuerpos opsonizantes y fijadores de complemento por parte de los linfocitos B. Sin embargo cuando un microorganismo no se puede remover de forma rápida del cuerpo, esta respuesta puede

hacerse peligrosa al desencadenar una fuerte reacción inflamatoria crónica^{2,73}. De forma contraria, las citocinas producidas por las células del tipo Th2, inducen la diferenciación, activación y la supervivencia de los eosinófilos (IL-5)⁷⁶⁻⁷⁹, promueven la producción de grandes cantidades de anticuerpos, inclusive IgE (IL-4, IL-13)⁸⁸⁻⁹¹, de células cebadas y basófilos (IL-4, IL-9 e IL-10)^{28,78}.

Debido a que el asma es un desorden mediado inmunológicamente, se ha demostrado que las citocinas juegan un papel único en la regulación del proceso inflamatorio que ocurre en los pulmones¹⁹⁻²⁹. No solo coordinan la inflamación sino que determinan su carácter e influyen en su cronicidad. Las citocinas presentes al momento de la exposición al alérgeno, son uno de los mayores determinantes de la dirección de las células T cooperadoras hacia una respuesta tipo Th1 o Th2. Las fuentes celulares de la IL-4 e IL-12 que dirigen la polarización de la respuesta inmune actualmente no están claras⁹²⁻⁹⁴.

Interleucina-4 (IL-4)

En las vías aéreas de los pacientes asmáticos, la IL-4 juega un papel crítico en el desarrollo de células de tipo Th2 y en la inhibición de la expresión de la IL-12⁷. Es una citocina crítica en el cambio de isotipo de las células B a favor de la producción de IgE^{2,95-98}, aunque este efecto puede ser aumentado por otras citocinas incluyendo a la IL-5, IL-10, IL-13 y TNF- α . En la patogénesis del asma, la liberación de IL-4 en la vía aérea promueve la metaplasia de las células goblet, hipersecreción de moco y reclutamiento de

eosinófilos al aumentar la expresión de VCAM-1 en las células endoteliales pulmonares. Las principales fuentes celulares de IL-4 en las vías aéreas del paciente asmático atópico como del no atópico lo son las células T CD4+ y en menor grado las células T CD8+, eosinófilos y células cebadas.

Interleucina-13 (IL-13)

La IL-13 es similar a la IL-4 en muchas formas, incluso comparten una subunidad de su receptor (IL-4R α). Su producción se encuentra restringida a linfocitos T activados, especialmente células Th-2, cebadas y basófilos. Recientemente se descubrió también producción de IL-13 en células dendríticas y NK. A la fecha no se ha descubierto la presencia de IL-13R α en linfocitos, por lo que esta citocina no actúa sobre las células T. A diferencia del IL-4R α que se expresa de forma ubicua, el IL-13R α 1 se encuentra limitado a una variedad de tejidos como: linfocitos B, monocitos, macrófagos, basófilos, células cebadas y células endoteliales. Se ha descrito como un fuerte modulador de la función de los monocitos y las células B. Disminuye la transcripción de IFN- γ y de IL-12 por lo que puede modular el medio ambiente celular al momento de la presentación del antígeno. Como la IL-4, la IL-13 puede estimular la producción de IgE y la expresión de VCAM-1 en las células endoteliales y activar a los eosinófilos al inducir la expresión de CD69. Se ha reportado un aumento en la expresión de mRNA tanto en sujetos con asma atópica como no atópica⁹⁹⁻¹¹⁶. Su principal fuente lo representan las célula T CD4+ y CD8+ y los basófilos.

Interleucina-10 (IL-10)

La IL-10 es un inhibidor de los macrófagos activados, monocitos y neutrófilos, capaz de inhibir la producción de citocinas Th1 incluyendo el IFN- γ y la IL-2. Por lo que está involucrada en el control homeostático de la respuesta inmune innata y la respuesta inmune mediada por células. Es producida por los macrófagos activados, linfocitos T (Th1, Th2 y reguladores) y algunas células no linfoides como los queratinocitos. Inhibe la expresión de moléculas coestimuladoras y las moléculas del MHC clase II en los macrófagos, estimula la proliferación de células B humanas, pero se desconoce hasta la fecha la importancia de esta última actividad.

La IL-10 es una citocina anti-inflamatoria que suprime la secreción de citocinas pro-inflamatorias, la inflamación de la vía aérea inducida por alérgenos y la hiperreactividad no específica de la vía^{2,25,94,117-122}.

Interleucina-12 (IL-12)

Esta citocina es secretada por las células dendríticas, células B y macrófagos. Se encuentra en una posición clave para influenciar la diferenciación de las células T cooperadores. Existe en forma de dos subunidades la p35 que es sintetizada por una gran variedad de células y la p40 que es sintetizada solo por células profesionales presentadoras de antígeno, por lo que es la citocina biológicamente activa; la IL-12 se secreta en forma dimérica. La principal acción de la IL-12 en los desórdenes atópicos es la de inhibir la síntesis de IgE y promover la diferenciación de las células Th1. También

estimula el crecimiento y la activación de células T y NK y su producción de IFN- γ . En el asma la concentración de mRNA IL-12 se encuentra disminuida y la misma aumenta con el uso de esteroides^{72,87,92-94}.

Interferón- γ (IFN- γ)

El interferón- γ es la citocina insignia de las células Th1. Tiene actividad antiviral, pero no es un interferón antiviral potente y sus funciones son principalmente como citocina efectora de la respuesta inmune. Es secretada por las células NK, células T (Th1 y CD8+). Sus acciones biológicas son: activación de macrófagos y aumento de su actividad antimicrobiana, cambio de isotipo a anticuerpos opsonizantes, desarrollo de células efectoras Th1 y aumento de la expresión de moléculas de MHC y presentación de antígenos^{116,123-126}.

Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α)

Es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda contra bacterias principalmente Gram negativas y es responsable de muchas de las complicaciones sistémicas de las infecciones severas. Su principal fuente son los monocitos, macrófagos, neutrófilos, células T, NK y células cebadas. Sus acciones biológicas principales son el reclutamiento de neutrófilos y monocitos a los sitios de infección al aumentar la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales vasculares^{72,78,127}.

Inmunoglobulina E (IgE)

La inmunoglobulina E juega un papel crucial en la respuesta alérgica⁹⁵⁻⁹⁸. La respuesta temprana alérgica está mediada principalmente por un proceso dependiente de IgE. Esta respuesta inmune se inicia cuando la IgE se une a sus receptores de alta afinidad (FcεRI) localizados en las superficies de las células cebadas y basófilos y posteriormente es entrecruzada por un alérgeno, causando la activación celular y la consecuente liberación de mediadores inflamatorios. Un gran número de estos mediadores, como la histamina, proteasas, heparina, TNF-α, hidrolasas y otros factores quimiotácticos, se encuentran preformados en las células. Otros compuestos como los eicosanoides, prostaglandinas y el factor activador de plaquetas se generan en un lapso de minutos y otros como la IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, etc se generan en un lapso de horas. El efecto de estos mediadores depende del tejido en el que son liberados. En la vía aérea estos mediadores rápidamente desencadenan edema de la mucosa bronquial, producción de moco, contracción del músculo liso bronquial y eventualmente reclutan un infiltrado inflamatorio. En los pacientes asmáticos expuestos a la inhalación de alérgenos, estos eventos moleculares y celulares inducen una obstrucción aguda de la vía aérea con una caída del FEV₁¹²⁸.

Además de asociarse a las células cebadas y basófilos a través de los receptores de alta afinidad (FcεRI), la IgE interactúa con otras células, como linfocitos T, eosinófilos, plaquetas, músculo liso bronquial y células mucosas, a través de un receptor de baja afinidad (FcεRII o CD23).

DIAGNÓSTICO DE ASMA

Estudios epidemiológicos sugieren que en la actualidad el asma se encuentra subdiagnosticada³. Esto puede reflejar la naturaleza no específica de los síntomas del asma y el hecho que los pacientes tienden a tolerar los síntomas intermitentes. Desafortunadamente, el correcto diagnóstico de la enfermedad es esencial para iniciar un tratamiento apropiado.

Información al respecto de la historia familiar del paciente es crítica en el diagnóstico de asma. Los síntomas reportados por los pacientes incluyen: sensación de falta de aire de forma episódica, sibilancias, opresión torácica y tos, los cuales se agravan por la noche y en las primeras horas de la mañana. El paciente puede tener historia de exacerbaciones recurrentes, las cuales son provocadas por alérgenos, irritantes, ejercicio o agentes infecciosos. Un marcador clínico muy útil del asma es el alivio de los síntomas después del uso de broncodilatadores o de antiinflamatorios y en ocasiones en forma espontánea. La variabilidad de los síntomas y la historia de que en la familia existe el diagnóstico de asma u otra enfermedad atópica, son evidencias que sugieren el diagnóstico.

Pruebas de Función Pulmonar

El clínico es capaz de identificar defectos ventilatorios obstructivos, pero tiene limitada la habilidad para calcular el grado de obstrucción de la vía aérea y predecir si la obstrucción es reversible. La evaluación del asma por lo tanto debe incluir una espirometría donde se mida VEF1: volumen forzado en el primer segundo, CVF: capacidad vital forzada y VEF1/CVF, antes y después de la administración de un broncodilatador de acción corta.

Estas medidas ayudan a determinar la existencia de obstrucción de la vía aérea y si es inmediatamente reversible. La obstrucción se puede observar con la disminución de la tasa VEF1/CVF (<75%). La reversibilidad de la obstrucción de la vía aérea se considera de significancia cuando es $\geq 12\%$ o de 200 ml del FEV1 o $\geq 15\%$ o de 200 ml en CVF después de inhalar el broncodilatador.

Estas medidas se basan en la relación existente entre la limitación del flujo aéreo y el tamaño del lumen de la vía aérea y en las propiedades elásticas del alveolo.

Guía GINA para el diagnóstico de asma

Las guías surgen de la necesidad de que todos los médicos hablemos el mismo idioma y utilicemos los mismos términos al diagnosticar y tratar esta enfermedad y para ayudar a los profesionales en la salud a reducir la prevalencia, morbilidad y mortalidad ocasionados por el asma^{3,4}. Es por estos motivos que bajo el auspicio de la Organización Mundial de la Salud, el Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos y el Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre de los Estados Unidos se intenta unificar los criterios de diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad, llevándose a cabo el Taller de Estrategia Global para el Manejo y Prevención del Asma.

Las guías GINA fueron diseñadas de una forma escalonada para el manejo a largo plazo del asma. El objetivo del tratamiento es el de llegar a controlar la enfermedad de tal forma que el paciente no tenga síntomas crónicos o si los presenta que sean mínimos (incluye a

los síntomas nocturnos), presente la menor cantidad de episodios, no tenga que recurrir a los cuartos de urgencias, requiera de lo menos posible de los broncodilatadores β_2 -agonistas, no tenga limitación en sus actividades (incluso ejercicio), que las variaciones de su flujo espiratorio pico (PEF) sean menores del 20%, que su PEF sea lo más cercano a lo normal y que los efectos secundarios de los medicamentos sean mínimos o no existan.

Las guías GINA categorizan al asma en cuatro diferentes grados de severidad: el grado 1 es intermitente, el grado 2 es leve persistente, el grado 3 es moderada persistente y el grado 4 es severa persistente (tabla 1)³. Este diseño permite el concepto de “bajar o subir al siguiente peldaño” en la terapia.

En la actualidad es posible que sean éstas las guías que más se utilicen a nivel internacional, en el diagnóstico, clasificación y tratamiento del asma, razón por la cual utilizamos sus criterios para el diagnóstico y clasificación de nuestros pacientes.

Pruebas cutáneas

Las pruebas cutáneas son el indicador, mejor establecido y más sensible, de enfermedad alérgica¹²⁹. Dentro de las técnicas de aplicación de estas prueba se encuentra la prueba PRICK.

Esta prueba fue descrita por primera vez en 1926 por Lewis y Grant y fueron popularizadas por Pepy en 1970. Las pruebas por prick son superiores a las pruebas de escarificación porque son más sensibles, más reproducibles y se relacionan mejor con las pruebas intradérmicas. Se pueden realizar de varias formas y por supuesto la técnica que se emplee influenciará de forma importante los resultados.

En general, la técnica implica la introducción, de una concentración predeterminada, de un antígeno (usualmente concentrado) en la piel, para que de 10 a 20 minutos después se interprete la respuesta, en forma de roncha - eritema. Esta respuesta se mide de 0 a 4+ dependiendo del tamaño de la roncha y el grado del eritema. La prueba clásica de prick, inicialmente se realizaba con una aguja hipodérmica de 25 G estéril. La aguja se introducía alrededor de 1 mm en la piel con un ángulo de aproximadamente 45° a través de la gota de antígeno. La piel se levantaba tratando de formar una especie de tienda de campaña para permitir que entrase una mayor cantidad del alérgeno. En la actualidad existen una gran variedad de formas de realizar dichas pruebas, que van desde pruebas de punto vertical hasta las pruebas de prick múltiples. La técnica descrita inicialmente es la que utilizamos e nuestro estudio.

Alergenos

Hacia finales del siglo XIX, Charles Blackley introdujo una nueva ciencia básica, la alergia¹³⁰. Realizando pruebas cutáneas, conteos de pólenes y pruebas de provocación nasal y bronquial, demostró que los granos de pólenes eran la causa de la fiebre del

heno. El grado con el cual el asma se relaciona con los granos de pólenes es un poco más difícil de determinar.

Los alérgenos se dividen en dos tipos: los intramuros y los extramuros. Un gran acumulo de evidencia ha demostrado que el efecto de la exposición a los alérgenos intramuros, juega un papel primordial en el asma atópica perenne. Por ejemplo, personas que viven en el África rural, rara vez son asmáticos, pero desarrollan asma al mudarse a las grandes ciudades. En los Estados Unidos y otras grandes ciudades como México DF, las personas cada vez viven menos o pasan menos tiempo en el campo. A medida que las personas se quedan más tiempo dentro de sus casas, su actividad decrece y cada vez demandan más niveles de comodidad. Las casa y apartamentos, además de los reservorios que por lo general tienen (alfombras que cubren la casa de pared a pared, cortinas y cobertores), tienen sistemas de ventilación que casi siempre no son los más adecuados. Por ejemplo, en muchos de los hogares de los Estados Unidos y el Reino Unido el sistema de ventilación solo realiza 0.2 cambios del aire por hora. Esto debe compararse con las normas federales de los Estados Unidos que demandan que los laboratorio con ratones tengan sistemas de ventilación que realicen 10 cambios del aire por hora. Así pues, la combinación de pasar más tiempo intramuros, poca actividad extramuros y la mayor exposición a una gran variedad de alérgenos, claramente contribuyen al desarrollo de asma atópica perenne .

Se han identificado como alérgenos más frecuentes a los ácaros, epitelios de perro y gato, polvo, pólenes y hongos. En 1992 Mejía y colaboradores¹³¹ identificaron como los pólenes más importantes del Valle de México a los siguientes árboles: *Fraxinus*

americana, *Quercus alveolata*, *Schinus molle*, *Pinus silvestris*; pastos como: *Capriola*, *Holcus alepensis*, *Lolium perenne*, *Agrostis alba*; malezas como: *Rumex crispus*, *Ambrosia eliator*, *Helianthus annus*, *Atriplex bacteosa* y a la *Artemisa tridentata*. En otro estudio realizado por Palomec y col.¹³³ en 1997 confirmaron esta frecuencia de los pólenes y agregaron que los hongos más frecuentes fueron *Candida* y *Fusarium* y los ácaros más frecuentes fueron el *Dermatophagoides pteronyssinus* y el *D. farinae*. En Estados Unidos existen estudios en donde se han aislado hasta 500 ácaros por gramo de polvo¹³². El alérgeno intramuro más frecuente resulta ser el ácaro.

Como las concentraciones de pólenes se ven influenciadas, en cierto grado, por la época del año; decidimos trabajar en nuestro estudios con pacientes que fueran alérgicos a los ácaros, ya que sus concentraciones son estables a lo largo del año en nuestro país; y para controlar los alérgenos extramuros se seleccionaron pacientes que viven en la misma zona y por lo tanto comparten las mismas concentraciones de contaminantes extramuros.

En nuestro país, y particularmente en nuestro servicio, carecemos de estudios clínicos o de laboratorio con los cuales podamos evaluar el estado inmunológico de los pacientes asmáticos.

JUSTIFICACIÓN

La incidencia, prevalencia, morbilidad y mortalidad del asma ha ido en aumento en las dos últimas décadas en todo el mundo. El asma es una enfermedad inflamatoria compleja del pulmón que se caracteriza por una obstrucción variable del flujo aéreo, hiperreactividad de la vía aérea e inflamación de la misma. La respuesta inflamatoria en el pulmón asmático, se caracteriza por la infiltración de las paredes de la vía aérea, de una variedad de células entre las que encontramos principalmente células cebadas, linfocitos y eosinófilos. Aunque la enfermedad tienen un origen multifactorial, se cree que el proceso inflamatorio de la forma más común de la enfermedad (asma extrínseca o alérgica), resulta de una respuesta inmune inapropiada a alérgenos comunes del medio ambiente, en individuos genéticamente susceptibles. Se ha propuesto que las células T CD4+ que producen las citocinas tipo Th2 juegan un papel principal en la patogénesis de la enfermedad. Por medio de la liberación de citocinas como IL-13, IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ estas células promueven el reclutamiento y activación de las células efectoras primarias de la respuesta alérgica, las células cebadas y los eosinófilos. La activación de estas células resulta en la liberación de una plétora de mediadores inflamatorios que individualmente o en conjunto inducen los cambios en la vía aérea y producen los síntomas característicos de la enfermedad. La prevalencia de asma en México se ha calculado que va de 2.7 a 21.8%, variando de forma importante de una región a otra.

En la literatura universal los valores de estas citocinas varían de estudio a estudio y en nuestro país a la fecha no se han realizado este tipo de mediciones y comparaciones.

La realización de este estudio surge de la necesidad de tener los valores basales del perfil inmunológico y de las pruebas de función respiratoria de pacientes con asma alérgica a *Dermatophagoides* en sus diferentes grados de severidad de acuerdo a la clasificación GINA y de forma comparativa, con personas sanas. Además, de la necesidad de encontrar si existe alguna relación entre las mediciones del perfil inmunológico y los diferentes grados de obstrucción calculados por espirometría.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades alérgicas respiratorias y en especial el asma, constituyen un problema de salud pública en nuestro país por el costo económico y social que representan, para los pacientes y la institución. El asma alérgica, en especial a ácaros y pólenes, es un problema cada vez más común. Los pacientes asmáticos atópicos presentan variabilidad en las concentraciones de citocinas plasmáticas y de algunos anticuerpos al comparárseles con los personas sanas no atópicas. De igual forma, dependiendo del grado de severidad clínica del asma, presentan diferentes grados de obstrucción e inflamación de las vías aéreas. Este estudio representa el primer intento en nuestro país de evaluar el perfil inmunológico y pulmonar de dichos pacientes y nos permitirá conocer si:

1. Existen diferencias entre los niveles de citocinas séricas (IL-4, IL-10, IL-13, IL-12p70, IFN- γ y TNF- α) de los pacientes asmáticos alérgicos a los ácaros y las personas sanas.
 - a. Existe algún tipo de correlación entre los niveles de citocinas (IL-4, IL-10, IL-13, IL-12p70, IFN- γ y TNF- α) y los grados de severidad según GINA.
 - b. Existe algún tipo de correlación entre los niveles de citocinas (IL-4, IL-10, IL-13, IL-12p70, IFN- γ y TNF- α) y los diferentes grados de obstrucción de la vía aérea calculados por espirometría.
2. Existen diferencias entre las concentraciones de la inmunoglobulina E (IgE) de los pacientes alérgicos a los ácaros y las personas sanas.

- a. Existe algún tipo de correlación entre los niveles de IgE y los grados de severidad según GINA.

- b. Existe algún tipo de correlación entre los niveles de IgE y los diferentes grados de obstrucción de la vía aérea calculados por espirometría.

OBJETIVOS

- 1- Determinar las concentraciones séricas de las citocinas IL-4, IL-10, IL-13, IL-12p70, IFN- γ y TNF- α de los pacientes con asma atópica y evaluar si existen diferencias significativas con las concentraciones de las personas sanas no atópicas.
 - a. Evaluar si existe alguna correlación entre las concentraciones de las citocinas IL-4, IL-10, IL-13, IL-12p70, IFN- γ y TNF- α y los diferentes grados de severidad del asma de acuerdo a la clasificación GINA.
 - b. Evaluar si existe alguna correlación entre las concentraciones de las citocinas IL-4, IL-10, IL-13, IL-12p70, IFN- γ y TNF- α y los grados variables de obstrucción de la vía aérea calculados por espirometría.
- 2- Determinar las concentraciones séricas de IgE de los pacientes asmáticos atópicos y evaluar si existen diferencias significativas con las concentraciones de las personas sanas no atópicas.
 - a. Evaluar si existe alguna correlación entre las concentraciones del anticuerpo y los grados de severidad según la clasificación GINA.
 - b. Evaluar si existe alguna correlación entre las concentraciones del anticuerpo y los grados variables de obstrucción de la vía aérea calculados por espirometría.

HIPÓTESIS

- 1- Existe correlación directa entre las concentraciones de IL-4, IL-10 e IL-13 e inversa entre las citocinas IL-12p70, IFN- γ y TNF- α con los diferentes grados de severidad del asma de acuerdo a la clasificación GINA
- 2- Existe correlación directa entre las concentraciones de las citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 e inversa entre las citocinas IL-12p70, TNF- α e IFN-gamma con los grados variables de obstrucción de la vía aérea calculados por espirometría

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio transversal comparativo de casos y controles.

UNIVERSO DE TRABAJO

Pacientes referidos de sus Unidades Médicos Familiares y Hospitales Generales de Zona del área de adscripción al Centro Médico Nacional Siglo XXI que fueron evaluados en el Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital de Especialidades y que se les hizo el diagnóstico de asma atópica. Para lograr la mayor cantidad de pacientes posibles se invitó, para que participaran del estudio, a los médicos internistas y neumólogos de cada una de las Unidades adscritas al Centro Médico Siglo XXI.

Los controles sanos se reclutaron, de forma voluntaria, entre los médicos residentes de la Unidad Médico Familiar #28 y algunos trabajadores de nuestro hospital.

DESCRIPCIÓN CONCEPTUAL DE LAS VARIABLES

A. VARIABLES INDEPENDIENTES:

- Diagnóstico de asma alérgica a ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus* y *D. farinae*) de acuerdo a los criterios internacionales del GINA.

B. VARIABLES PENDIENTES:

- Pruebas de función pulmonar
- Concentración de citocinas
- Concentración de IgE

C. VARIABLES UNIVERSALES:

- Edad
- Sexo

D. VARIABLES DE CONFUSIÓN:

- Tabaquismo

DEFINICIÓN OPERATIVA DE LAS VARIABLES

- **Grados de Severidad:** los grados de severidad fueron evaluados de acuerdo a la clasificación GINA. Se consideró una variable cualitativa ordinal (se reportaron como intermitente, leve persistente, moderada persistente y severa persistente).

- **Pruebas de función pulmonar:** evaluadas por medio de los resultados obtenidos de las pruebas de función pulmonar que se realizaron en el Laboratorio de Fisiología Pulmonar del Hospital de Cardiología del CMN Siglo XXI.

1. **Capacidad Vital Forzada (CVF):** es la máxima cantidad de aire que puede ser expulsada mediante una espiración máxima, la cual va precedida de una inspiración también máxima. Ambas se deben realizar con un máximo esfuerzo. Se consideró una variables cuantitativa discreta (se reportó en forma de porcentaje).
2. **Volumen Espiratorio Forzado del primer segundo (VEF₁):** representa el volumen espirado al final del primer segundo de la CVF. Se consideró una variable cuantitativa discreta (se reportó en forma de porcentaje).
3. **Relación entre el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF₁) y el % de la capacidad vital forzada (CVF) VEF₁/CVF:** expresa qué fracción porcentual de la CVF ha sido expulsada al finalizar el primer segundo de la espiración. Se considera un valor normal por arriba del 75%. Se consideró una variables cuantitativa discreta (se reportó en forma de porcentaje).
4. **Velocidad del Flujo al 50% (VF 50%):** mide la velocidad máxima que alcanza el flujo espiratorio cuando el individuo ha expulsado el 50% de su capacidad vital forzada. Se consideró una variables cuantitativa discreta (se reportó en forma de porcentaje).
5. **Velocidad del Flujo al 75% (VF 75%):** mide la velocidad máxima que alcanza el flujo espiratorio cuando el individuo ha expulsado el 75% de su

capacidad vital forzada. Se consideró una variable cuantitativa discreta (se reportó en forma de porcentaje).

6. **Obstrucción de la Vía Aérea de Mediano Calibre:** es el grado de obstrucción de la vía aérea calculado espirométricamente mediante la comparación del porcentaje de la CVF, VEF1, la relación VEF1/CVF y el VF 50%. Se consideró una variable cualitativa ordinal (Se reportó como normal, leve, moderada, importante, muy importante y grave).
 7. **Obstrucción de la Vía Aérea de Pequeño Calibre:** es el grado de obstrucción de la vías aérea calculado espirométricamente mediante la comparación del porcentaje de la CVF, VEF1, la relación VEF1/CVF y el VF 75%. Se consideró una variable cualitativa ordinal (Se reportó como normal, leve, moderada, importante, muy importante y grave).
- **Anticuerpos y Citocinas:** las concentraciones fueron determinadas de acuerdo a los estándares internacionales, en nuestro Hospital (Laboratorio Clínico Principal) y en la Unidad de Investigación en Inmunoquímica. Se consideraron como variables cuantitativas numéricas (Se reportaron como números enteros y decimales).
 1. **IgE (Inmunoturbidimetría Roche ^{MR}, lector Hitachi ^{MR} 911):** es la concentración sérica de la inmunoglobulina E en UI/ml determinadas en el Laboratorio Clínico Principal del H. E. CMN Siglo XXI
 2. **IL-4 (ELISA OptIEA-PharMingen ^{MR}):** concentración sérica de la citocina en el suero de pacientes y sanos.

3. **IL-10 (ELISA PharMingen^{MR})**: concentración sérica de la citocina en el suero de pacientes y sanos.
 4. **IL-13 (ELISA OptIEA-PharMingen^{MR})**: concentración sérica de la citocina en el suero de pacientes y sanos.
 5. **IL-12p70 (ELISA PharMingen^{MR})**: concentración sérica de la citocina en el suero de pacientes y sanos.
 6. **IFN- γ (ELISA PharMingen^{MR})**: concentración sérica de la citocina en el suero de pacientes y sanos.
 7. **TNF- α (ELISA OptIEA-PharMingen^{MR})**: concentración sérica de la citocina en el suero de pacientes y sanos.
- **Edad**: tiempo transcurrido desde el nacimiento del individuo, hasta el momento en que se presentó al Servicio de Alergia e Inmunología Clínica. Se consideró una variable cuantitativa (se cuantificó en número de años). Se controló esta variable al ajustar la edad en los criterios de inclusión.
 - **Sexo**: es el conjunto de características fenotípicas manifestadas al momento de nacer. Se consideró una variable cualitativa dicotómica (se clasificó como masculino o femenino).
 - **Tabaquismo**: hábito de fumar de forma activa, desarrollado por una persona. Se controló esta variable entre los criterios de inclusión. Se consideró una variable cualitativa dicotómica (se clasificó como positivo o negativo).

SELECCIÓN DE LA MUESTRA

A. TAMAÑO DE LA MUESTRA: por conveniencia se admitieron, al estudio, a todos los pacientes con el diagnóstico de asma alérgica a ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus* y *D. farinae*), que cumplieran con los criterios de inclusión y aceptaran participar en el mismo, en un período comprendido entre marzo del 2001 y febrero del 2002.

Los controles sanos fueron captados entre los médicos residentes de Medicina Familiar de la Clínica 28 y entre el personal de nuestro hospital, que quisieran participar de forma voluntaria en el estudio.

B. CRITERIOS DE SELECCIÓN:

- **CRITERIOS DE INCLUSIÓN:**

- a. Pacientes asmáticos alérgicos únicamente a ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus* y *D. farinae*).
- b. Con cualquiera de los grados de severidad de acuerdo a la clasificación GINA
- c. De uno u otro sexo
- d. Con edades entre los 16 y 55 años
- e. La aceptación por parte del paciente de participar en el estudio de forma totalmente voluntaria y que firmaran la hoja de consentimiento informado.

- **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

- a. Asma no alérgica
- b. Que se encontraran utilizando β -bloqueadores
- c. Enfermedades crónicas (rinosinusitis o rinoconjuntivitis, autoinmunes, inmunodeficiencias, insuficiencia renal aguda o crónica, cardiopatías etc.)
- d. Déficit de tipo mental o físico que les imposibilitara comunicarse con el médico
- e. Pacientes en tratamiento con inmunosupresores tópicos y sistémicos
- f. El uso de esteroides orales y de preferencia que no estuvieran utilizando los inhalados
- g. Fumadores

- **CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN:**

- a. Pacientes embarazadas

C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

De acuerdo al comportamiento de las muestras se utilizará el programa de computo SPSS para windows v.10 para obtener los siguientes parámetros:

- Estadística descriptiva (media, mediana, desviación estándar, percentiles, etc.)
- Estadística no paramétrica (prueba de la mediana, U de Mann-Whitney, Kruskal Wallis)
- Correlación de Pearson

D. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El estudio no representa riesgos para el paciente, no se pone en riesgo su salud ni se violan sus derechos de ningún modo, incluso los resultados obtenidos en los diferentes estudios, permitirán conocer mejor su estado general de salud y su respuesta inmunológica y podrían ser útiles para brindarle un mejor tratamiento oportuno a la alergia a ácaros.

E. RECURSOS PARA EL ESTUDIO

- **Humanos:** médicos investigadores y personal de los laboratorios involucrados.
- **Materiales:** computadora personal, impresora, ensayos de valoración para IgE, IL-4, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNF- α e IFN- γ , lavador de ELISA, lector de ELISA, placas para ELISA, micropipetas, puntas de pipetas, programas de computación, etc.
- **Económicos:** el proyecto recibió el patrocinio del FOFOI (066/2001) y de forma indirecta de la U. I. M. en Inmunoquímica, quienes aportaron reactivos y el material para trabajar los Kits de ELISA.

PROCEDIMIENTO

Se incluyeron en el estudio a pacientes referidos de sus Unidades de Medicina Familiar y Hospitales Generales de Zona del área de adscripción al Centro Médico Nacional Siglo XXI (3 Suroeste) para que fueran evaluados en el Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital de Especialidades y se les realizó el diagnóstico de asma atópica.

Estos pacientes fueron evaluados a través del sistema de valoraciones de nuestro servicio en donde se les realizaba un interrogatorio y examen físico completos, con el fin de descartar otros padecimientos que no fueran alérgicos y evaluar la probabilidad de que el padecimiento pulmonar, que lo traía a nuestro servicio, fuera en realidad asma y definitivamente de tipo atópico.

A los voluntarios sanos, se les realizó la historia clínica oficial del Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI, con el fin de descartar la presencia de otra enfermedad o alergias. No deberían ser fumadores y deberían haberse encontrado completamente sanos en las últimas 4 semanas previas al estudio.

El diagnóstico definitivo de atopia se llevaba a cabo con la aplicación de pruebas cutáneas tipo PRICK con extractos estandarizados internacionalmente en Unidades Alérgicas (UA). Las pruebas cutáneas deberían presentar concordancia con el interrogatorio clínico y examen físico. Estas pruebas se realizaron con los alérgenos que más frecuentemente hacen reacción en nuestro servicio^{131,133}: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, *Lolium perenne* (pasto), *Phleum pratense* (hierba timotea),

Cynodon dactylon (pata de gallo o grama mayor), *Ligustrum vulgare* (aliguate), *Olea europea* (olivo), *Quercus robur* (roble), *Periplaneta americana* (cucaracha) (IPI ASAC-España^{MR}). Se consideró una prueba positiva a la formación de un habón (roncha) de 3mm en su diámetro medio (el promedio de la suma de su diámetro mayor y su diámetro perpendicular), el control positivo fue hecho con histamina HCL 10 mg/ml (IPI ASAC-España^{MR}) y el control negativo con solución salina (IPI ASAC-España^{MR}).

Una vez realizado el diagnóstico de asma alérgica a ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus* y *D. farinae*) se les invitó a participar en el estudio explicándoseles los riesgos y beneficios. Si aceptaban participar, se les pedía que firmaran la hoja de consentimiento y se les tomaba una muestra de sangre venosa de alrededor de 7 ml, en tubos sin anticoagulante para la obtención del suero y determinación de las citocinas IL-4, IL-10, IL-13-13, IL-12p70, INF- γ y TNF- α por ELISA. El mismo proceso se realizó con los controles sanos.

Además, se les realizó exámenes paraclínicos generales, en el Laboratorio Clínico Principal de nuestro hospital, que incluían una biometría hemática completa, IgE sérica total y 3 exámenes seriados de heces, con el fin de descartar la presencia de parásitos. Se le realizó una radiografía pulmonar en el Servicio de Radiología de nuestro centro y una espirometría en el Laboratorio de Fisiología Pulmonar del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Todo esto dentro de la siguiente semana de su ingreso al estudio.

Una vez tomadas las muestras de sangre se llevaban a la Unidad de Inmunoquímica de nuestro hospital en donde se le dejaba reposar por alrededor de 30 minutos para que se les formara un coágulo, luego eran centrifugadas a 2500 revoluciones por minuto a 20 °C., durante 10 minutos. El suero era alicuotado en tubos Eppendorf con 250 µl de suero, los cuales eran congelados a -70°C para su posterior utilización.

A todas las muestras se les determinaron las concentraciones de las citocinas IL-4, IL-10, IL-13, IL-12p70, INF- γ y TNF- α , mediante ELISA.

RESULTADOS

Pacientes, Severidad del Asma - Clasificación GINA

Se incluyeron en el estudio 38 pacientes, 25 mujeres (65.8%) y 13 hombres (34.2%). Los controles fueron 19 personas sanas, 10 eran mujeres (52.63%) y 9 hombres (47.37%). La edad promedio global de los pacientes fue de 29 ± 10 años, la de los pacientes femeninos era de 32 ± 10 y la de los masculinos de 25 ± 11 . Mientras que la edad global de los controles sanos fue de 30 ± 4 años, los controles femeninos tenían una edad promedio de 30 ± 5 y los controles masculinos de 31 ± 2 .

De los 38 pacientes asmáticos alérgicos a los ácaros, 4 (10.5%) sufrían asma leve intermitente, 9 (23.7%) asma leve persistente, 22 (57.9%) asma moderada persistente y 3 (7.9%) asma severa persistente (gráfico 1).

Concentración Plasmática de Citocinas Th-2/Th-1 y Severidad

Se agruparon las citocinas como Th-2 o pro-inflamatorias (IL-4, IL-10, IL-13) y Th-1 o anti-inflamatorias (IL-12p70 e IFN- γ). Se compararon las medianas, de los controles sanos y de los pacientes, en cada uno de los grupos y no se encontraron diferencias significativas (para las Th-1, $p = 0.895$ y para las Th-2, $p = 0.828$). Se compararon mediante la Prueba U de Mann-Whitney los dos tipos de citocinas entre los sanos no encontrándose diferencia significativa ($p = 0.264$) y entre los pacientes ($p = 0.259$).

También se analizaron de forma separada cada una de las citocinas de ambos grupos, no encontrándose de igual forma, diferencias significativas entre sanos y pacientes en ninguna de ellas (cuadro 1). La única citocina que mostró diferencia intergrupar fue la IL-13, cuya mediana fue mayor en los pacientes, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (figura 1). La mediana de la IL-4 y de la IL-10, como se puede observar en la figura 1, fue menor en los pacientes, aunque al igual que con la IL-13 la diferencia tampoco fue significativa. Entre las citocinas de tipo Th-1, el IFN- γ mostró una ligera disminución en su mediana; en cambio la IL-12p70 mostró un ligero aumento en su concentración, estos hallazgos tampoco fueron significativos (figura 2).

En las tablas 2, 3 y 4 se pueden observar los promedios y medianas de cada una de las citocinas de acuerdo al grado de severidad y al grado de obstrucción de las vías aéreas de los pacientes y de los controles sanos.

El TNF- α presentó valores menores de 7.8 pg/ml que es el valor mínimo de detección del kit utilizado en nuestro estudio, tanto en los controles sanos como en los pacientes.

Se pensó que el sexo podría influir en las concentraciones de las citocinas, entre los pacientes asmáticos y los controles sanos; por lo que se contrastó el sexo para ambos grupos de citocinas, no encontrándose, en general, que el sexo influyera de forma significativa en los pacientes. En los controles sanos el IFN- γ y la IL-12p70 fueron la excepción para este hallazgo ya que los hombres tenían una mediana y un rango

promedio significativamente menores que las mujeres [13.17 vs 27.6 y 86.55 vs 166.55 ($p \leq 0.005$ y $p = 0.07$ respectivamente)] y [7.11 vs 12.6 y 6.44 vs 13.2 ($p = 0.034$ y $p = 0.009$)] (figura 3).

Se clasificó la severidad del asma según la clasificación GINA y se compararon con las diferentes medianas de las concentraciones de las citocinas, encontrándose que solo la IL-13 mostraba una diferencia significativa $p = 0.027$ (figuras 4 y 5).

También se investigó si la edad influía de alguna forma en las concentraciones séricas de las citocinas. Como el rango de edad de los pacientes variaba de 16 a 53 años, se agruparon en diferentes categorías o puntos de corte para identificar a que edad se observa algún cambio en las concentraciones de las citocinas (≤ 30 vs > 30 ; ≤ 25 , 25-30 y > 30 ; < 35 vs ≥ 35). Al comparar a los menores de 35 años contra los de 35 o más años, se observó que a partir de los 35 años se obtenían consistentemente, rangos promedios más bajos entre los de 35 o más años en todas las citocinas; solo que esta diferencia no fue significativa. Cuando se compararon a la edad menor o igual de 30 años contra la mayor de 30 años se encontró que existía diferencia significativa en el IFN- γ ($p = 0.049$) y la IL-13 ($p = 0.027$). Estas diferencias no se observaron entre los sanos (figuras 6 y 7).

Correlaciones entre las citocinas, Volumen Espiratorio Forzado en el Primer Segundo (VEF₁) y la IgE en pacientes y controles sanos

Se sabe que existe algún tipo de correlación entre los diferentes grupos de citocinas y en

nuestro estudio esta correlación se buscó a través del coeficiente de correlación de Pearson.

Se correlacionó a todas las citocinas de los controles sanos y los pacientes entre sí y contra la IgE y el VEF₁. Entre nuestros controles sanos encontramos una correlación de moderada a buena entre la IL-13 y la IL-4 ($r = 0.678$, $p = 0.002$), correlación que no se aprecia en los pacientes. No encontramos correlación entre las otras citocinas, el VEF₁ y la IgE (figura 8a).

En los pacientes asmáticos alérgicos a los ácaros, encontramos cierto grado de correlación entre la IL-4 y la IL-10 ($r = 0.319$, $p = 0.025$), entre el IFN- γ y la IL-4 ($r = 0.482$, $p = 0.001$) y entre el IFN- γ y la IL-13 ($r = 0.362$, $p = 0.014$) y una correlación de moderada a buena entre el IFN- γ y la IL-10 ($r = 0.527$, $p \leq 0.001$), (figuras 8b y 9). El resto de las citocinas no mostraron algún grado de correlación entre ellas ni con el VEF₁ o la IgE.

Se correlacionaron las concentraciones de las citocinas Th-1 y Th-2 agrupadas; en las Th-1 se consideraron a la IL-12p70 y al IFN- γ y en las Th-2 primero se agruparon a la IL-10 y a la IL-4; para el grupo total se obtuvo una correlación global negativa e inversa ($r = -0.099$, $p = 0.295$) ya que a medida de que teníamos concentraciones mayores de Th-2 las concentraciones de las citocinas Th-1 eran menores (figura 10a). También se correlacionaron, como Th-2, las IL-10 e IL-13 ($r = -0.259$, $p = 0.006$) (figura 10b) y posteriormente a la IL-4 e IL-13 ($r = -0.307$, $p = 0.001$) (figura 11), ambos grupos se

correlacionaron contra las citocinas Th-1. Se calculó la razón Th-2/Th-1, en Th-2 se incluyeron la IL-4 y la IL-10, obteniéndose una $p = 0.199$. Posteriormente se integraron a las citocinas Th-2 a la IL-4 y a la IL-13. Se calculó la razón obteniéndose una $p = 0.846$. También se calculó la razón IL-4/IFN- γ para pacientes y controles sanos, por ser dos de las citocinas más importantes de cada grupo obteniéndose una $p = 0.351$.

Volumen Espiratorio Forzado en el Primer Segundo (VEF₁), Concentración Plasmática de Citocinas Th-1/Th-2 e IgE

La mediana del volumen forzado en el primer segundo (VEF₁) de los pacientes asmáticos, presentó una diferencia significativa al comparársele con la mediana de los controles sanos, 88.5% de su valor predictivo vs 108.09% ($p < 0.001$) (figura 12a).

No encontramos diferencias significativas entre pacientes, al comparar los diferentes grados de severidad del asma y el VEF₁ ($p = 0.081$) (figura 12b). A pesar de que la diferencia del VEF₁ entre los distintos grados de severidad del asma no es significativa se puede observar en la figura que el VEF₁ disminuye a medida aumenta la severidad del padecimiento en los pacientes.

El valor del VEF₁ no se vio influenciado por el sexo en los controles sanos o en los pacientes asmáticos ($p = 0.153$ y $p = 0.724$ respectivamente) alérgicos a los ácaros (figura 13 a).

De igual forma no se encontró que la edad, en los distintos rangos estudiados, influenciara de forma significativa el VEF₁ de los pacientes ($p = 0.919$) o de los controles sanos ($p = 0.167$) (figura 13b).

El VEF₁ presentó correlación negativa con la IL-4 ($r = -0.371$, $p = 0.013$) (figura 14) y en menor grado con la IL-10 ($r = -0.25$, $p = 0.071$) pero no presentó correlación alguna con el resto de las citocinas en los pacientes asmáticos y entre los controles sanos.

Se encontraron diferencias significativas entre el VEF₁ y el grado de obstrucción de las vías aéreas de mediano y pequeño calibre (rango promedio y mediana significativa con $p \leq 0.001$ ambas) (figura 15).

Concentración Plasmática de Citocinas Th-2/Th-1 y Grados de Obstrucción de las Vías Aéreas de Mediano y Pequeño Calibre

La obstrucción de las vías aéreas de mediano y pequeño calibre se calculó por medio de una espirometría basal, realizada al momento del ingreso del paciente al estudio, la cual fue interpretada y reportada por el servicio de fisiología pulmonar del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Esta era reportada dependiendo del grado de obstrucción calculado por el interprete y reportada como normal, leve, moderada, importante, muy importante y grave.

Se compararon las concentraciones de las citocinas con los diferentes grados de

obstrucción de la vía aérea de mediano calibre encontrándose que solo la IL-4 mostraba una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.007$) entre los diferentes grados de obstrucción (figura 16a).

Esta diferencia significativa entre la IL-4 y los diferentes grados de obstrucción de la vía aérea de mediano calibre se pierde al comparar la citocina (IL-4) con la obstrucción de las vías aéreas de pequeño calibre (figura 16b). El resto de las citocinas (IL-10, IL-13, IL-12p70, IFN- γ y TNF- α) tampoco mostraron diferencias significativas con los diferentes grados de obstrucción de las vías aéreas de pequeño calibre.

Correlaciones entre las Citocinas, la IgE y los Diferentes Grados de Obstrucción

Correlacionamos las concentraciones de las diferentes citocinas y la IgE con los diferentes grados de obstrucción de las vías aéreas de pequeños y mediano calibre.

Obtuvimos una correlación de moderada a buena entre la IL-13 y la IL-12p70 ($r = 0.563$, $p = 0.029$) en pacientes con obstrucción moderada de las vía aéreas de pequeño calibre, no así entre las otras citocinas y la inmunoglobulina E. En los pacientes con obstrucción importante no observamos correlaciones entre ninguna de las citocinas o la inmunoglobulina. En los pacientes con obstrucción muy importante o grave el IFN- γ presentó una correlación de moderada a buena con la IL-10 ($r = 0.636$, $p = 0.014$) y con la IL-13 ($r = 0.649$, $p = 0.012$), al igual que una buena a excelente correlación con la IgE ($r = 0.824$, $p = 0.023$).

Cuando la obstrucción era importante en los pacientes con obstrucción de las vías aéreas de mediano calibre, obtuvimos correlación buena a excelente entre la IL-10 y el IFN- γ ($r = 0.816$, $p = 0.007$) y de moderada a buena entre la IL-4 y el IFN- γ ($r = 0.672$, $p = 0.048$). En el caso de la obstrucción muy importante existió una correlación de buena a excelente entre la IL-13 y el IFN- γ ($r = 0.801$, $p = 0.031$) y entre la IgE y el IFN- γ ($r = 0.962$, $p = 0.009$).

No encontramos mayores correlaciones entre las diferentes concentraciones de citocinas, IgE y el VEF₁ en los distintos grados de obstrucción, tanto de las vías aéreas de mediano como las de pequeño calibre.

Concentración de IgE, Severidad del Asma y Grados de Obstrucción de las Vías Aéreas

La IgE mostró diferencia significativa entre sanos y pacientes ($p \leq 0.001$) (figura 17a).

No existieron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de IgE y los grados de severidad del asma. A pesar de esto encontramos que todos los niveles séricos de los pacientes se encontraban por arriba de los controles sanos (figura 17b).

La edad no influyó de forma significativa ($p = 0.301$) en las concentraciones de IgE (figura 18a).

No existió diferencia significativa entre los diferentes grados de obstrucción de las vías aéreas de mediano calibre y la IgE ($p = 0.282$)(figura 18b) y las de pequeño calibre ($p = 0.649$)(figura 19). Aunque al graficar estas variables podemos observar una tendencia a aumentar con el grado de severidad sobretodo si no se toma en cuenta el grado grave ya que son pocos los pacientes que presentan este grado de severidad.

DISCUSIÓN

En este estudio, donde incluimos 38 pacientes asmáticos alérgicos a los ácaros (*Dermatophagoides pteronissymus* y *D. farinae*) y 19 controles sanos, se pudo observar que la prevalencia es mayor en las mujeres; éstas representaron casi los 2/3 (65.8%) de nuestros pacientes. La gran mayoría de los pacientes asmáticos tienen un grado de severidad leve o moderado y solo del 5 al 10% sufre de asma severa⁸⁰, en nuestro estudio solo el 8% de los pacientes sufrían de asma severa persistente. Un comportamiento similar al descrito en la literatura universal sobre el asma^{3,84}.

Las determinaciones del TNF- α que obtuvimos fueron menores de 7.8 pg/ml (concentración mínima detectada por nuestro kit), hallazgos parecidos a los obtenidos por Tomita et al⁹⁴ en donde determinaron la concentración sérica de TNF- α en el suero de adultos asmáticos, obteniendo valores séricos muy bajos cuando se llegaban a obtener. En este estudio se cultivó la sangre con LPS encontrándose que no habían diferencias en las concentraciones del TNF- α entre pacientes asmáticos leves, severos y controles sanos, obtuvieron valores por debajo de los 5 ng/ml. Este hallazgo lo podríamos explicar si las concentraciones de IL-10 en nuestros pacientes estuvieran altas y así inhibieran la producción de TNF- α .

Al agrupar las citocinas con pro-inflamatorias (Th-2) y anti-inflamatorias (Th-1) pudimos constatar la existencia de correlaciones escasas o con cierto grado de correlación. Estas correlaciones fueron inversas (negativas) dándonos a entender de que a medida que las

concentraciones de las citocinas Th-2 aumentan las Th-1 disminuyen o viceversa. Este hallazgo concuerda por lo descrito por Gajewski y Fish y Fernández-Botran y col. en 1988 cuando demostraron la relación inversa entre las citocinas TH-2/Th-1.

Existen otros estudios en donde se ha demostrado que el número de células TNF- α positivas es mayor en biopsias bronquiales de sujetos asmáticos sintomáticos que en aquellos asintomáticos^{78,140}. Recordemos que todos nuestros pacientes eran asintomáticos al momento de tomar las muestras, por lo que podría ser esta la razón de obtener valores tan bajos de TNF- α entre nuestros pacientes.

No se obtuvieron diferencias significativas al comparar las concentraciones de la IL-4, IL-10, IL-12p70 e IFN- γ entre los controles sanos y los pacientes. Este comportamiento en nuestros pacientes no corrobora la tesis, más aceptada a nivel mundial, sobre la patogénesis del asma que se basa en el desbalance que existe entre las citocinas de tipo Th-2 y Th-1.

La IL-4 es una de las dos citocinas, hasta el momento conocidas, que causan el cambio de isotipo a IgE en las células B, un prerrequisito para una síntesis elevada de IgE y por inferencia en la patogénesis de la atopía⁹⁵. Nuestros hallazgos no apoyan esta hipótesis ya que los pacientes presentan niveles significativamente elevados de IgE en comparación a los controles y la IL-4 tiene concentraciones incluso por debajo de los controles sanos. Como podemos ver con nuestros resultados, no se requiere obligatoriamente del papel IL-4/IgE en la patogénesis del asma atópica crónica.

Es importante resaltar que nuestros datos no excluyen la posibilidad de que el asma pueda ser exacerbada de forma aguda por la liberación de mediadores dependientes de IgE de las células cebadas después de una exposición aguda a alérgenos que provocarían la liberación de sustancias broncoconstrictoras en una vía aérea hiperreactora. Una posible explicación para este hallazgo es el hecho de que nuestros pacientes tienen mayores niveles de IL-13 que los controles sanos, lo que pudiera estar causando el cambio de isotipo a IgE, ya que la IL-4 comparte el receptor de la IL-13 (IL-4R α). No obtuvimos una correlación importante entre la IL-13 y la IgE con la cual podríamos haber reafirmado esta hipótesis. Otra explicación podría ser que la vida media de la IgE en suero es más prolongada que la vida media de cualquiera de las citocinas o bien que solo se requieren de concentraciones mínimas para lograr el cambio de isotipo en la célula B.

A la IL-4 la pudimos correlacionar con el grado de obstrucción de las vías aéreas de mediano calibre, pero no con el grado de severidad de la enfermedad. Este hallazgo no concuerda con lo descrito en la literatura universal en donde existen múltiples estudios en los que se involucra, a esta citocina, con la hiperreactividad de la vía aérea, pero no con el grado de obstrucción, cuyo principal componente es la inflamación. El que exista inflamación en la vía aérea no necesariamente predispone a que ésta sea hiperreactora. Se ha relacionado más con la inflamación alérgica a la IL-5 y al influjo de eosinófilos. Algunos estudios han demostrado niveles elevados del mRNA para IL-4 en linfocitos T estimulados¹⁴¹ al comparar los resultados de los pacientes contra los controles sanos, los investigadores del mencionado estudio encontraron una buena correlación entre los niveles de mRNA para IL-4 con la prueba de provocación con adenosina y metacolina

(PC₂₀AMP). Se han estudiado los niveles del mRNA para IL-4 en linfocitos T estimulados¹⁴¹, en biopsias bronquiales¹⁴² y en células de lavados broncoalveolares^{90,101} y comparado con diferentes grados de hiperreactividad. Los hallazgos varían de estudio a estudio, en el primero los niveles de mRNA fueron mayores en los asmáticos encontrándose relación con la hiperreactividad de la vía aérea, en el segundo y tercero los niveles de mRNA no fueron diferentes de forma significativa entre sanos y pacientes y no se observó que existiera alguna diferencia con respecto a la severidad de los síntomas y a la hiperreactividad de la vía aérea. Con nuestros hallazgos no podemos confirmar o negar esta relación, ya que requeriríamos realizar pruebas de provocación como la antes mencionada para comparar las diferentes concentraciones de la interleucina con los grados de hiperreactividad.

Al correlacionar a la IL-4 con el VEF₁ encontramos una correlación negativa que se traduce de la relación que existe entre el VEF₁ y el grado de obstrucción de la vía aérea, entre mayor es el grado de obstrucción menor es el VEF₁.

Debido a que nuestros pacientes no mostraron niveles de citocinas en sangre mayores que los controles sanos, no pudimos corroborar la hipótesis de que a pesar de que la síntesis de las citocinas se produce a nivel local, en el caso del asma a nivel de la mucosa bronquial y probablemente en los órganos linfoides regionales, si se llegan a producir grandes cantidades estas citocinas pueden ejercer una función endocrina.

En la actualidad es difícil referirnos a la IL-13 sin tomar en cuenta a la IL-12, inclusive se ha llegado a referir a este eje IL-13/IL-12 como un Yin-Yang. La IL-13 presenta

diferencias significativas entre los diferentes grados de severidad del asma. Existen diversos estudios en donde se ha demostrado que la sobreproducción de IL-13 juega un papel primordial como citocina efectora en la hiperplasia de las células goblets y en la hiperreactividad^{101,108} e inflamación de la vía aérea, aunado probablemente a un defecto en la producción de la IL-12. Podría ser esta relación con la hiperreactividad, la que nos explicara su relación con la sintomatología.

Entre nuestros pacientes no encontramos correlación entre la IL-13 y la IL-12 pero sí entre la IL-13 y el IFN- γ , esta correlación fue positiva, hallazgo similar a los de diferentes estudios en donde la correlación entre estas dos citocinas también fue positiva⁹⁵. Esta correlación existente entre la IL-13 y el IFN- γ , encontrada en nuestro estudio, apoya el dato de que la IL-13 es un mediador parcial en los cambios observados en los pulmones de los pacientes asmáticos y sobretodo en los pacientes con mayor grado de severidad, ya que es prácticamente imposible que tengamos una respuesta únicamente de tipo Th-2 o de Th-1. Hay trabajos en los que se ha demostrado que tanto la IL-13 como el IFN- γ inducen un tipo distinto de inflamación y que ambas citocinas pueden preparar a los pulmones para una respuesta aumentada a un alérgeno.

En nuestro trabajo la IL-12 no mostró diferencias significativa entre pacientes y controles sanos, ni entre los grados de severidad. Estos resultados concuerdan con los de otros estudios en donde tampoco se encontraron diferencias entre sanos y pacientes y los grados de severidad^{94,145}. Estos investigadores solo demostraron diferencias significativas al estimular a los monocitos con LPS, encontrando que la concentración de

IL-12 se encontraba disminuida solo en los pacientes con asma severa. Tampoco la hallamos correlacionada con los grados de obstrucción, IgE o el VEF₁.

De forma similar a lo reportado por otros investigadores, no encontramos diferencias significativas entre las concentraciones séricas de IFN- γ de los controles sanos y los pacientes^{84,143,144}. A pesar de que en estos trabajos se determinó la concentración de mRNA para el IFN- γ en el lavado bronquial, de pacientes asmáticos, no encontraron diferencias al compararlos con sujetos sanos.

Tampoco encontramos que existiera alguna diferencia entre los diferentes grados de severidad del asma y la concentración de esta citocina. Existen algunos estudios donde sí han encontrado correlación con hiperreactividad bronquial¹⁰¹, pero no pudimos encontrar alguno que lo correlacionara con la severidad del padecimiento de forma directa. Cuando correlacionamos al IFN- γ con las citocinas Th-2 encontramos que las mismas se encontraban correlacionadas de forma importante solo que esta correlación era positiva en vez de negativa como se esperaba en la mayoría de los casos, de acuerdo a otros estudios. Nosotros no encontramos correlación entre el IFN- γ y la IgE total. En el estudio realizado por Kimura y col.⁹⁵ determinaron la correlación del IFN- γ producido por mononucleares de sangre periférica estimulados con el antígeno del ácaro del polvo casero y la producción del IgE específica al ácaro, hallazgo que difiere al nuestro aunque los estudios no sean comparables ya que el de Kimura se realizó *in vitro*.

Encontramos en nuestro estudio que la concentración de la IL-10 se encuentra por debajo de los niveles hallados en los controles sanos. Han existido diferentes reportes sobre su producción en pacientes asmáticos en donde, puede existir elevada en los pacientes^{25,137-138} así como puede encontrarse disminuida¹³⁹, como ocurre en nuestro estudio. Al realizar una comparación de las concentraciones de la IL-10 con los diferentes grados de severidad en nuestro estudio, se puede observar que estas concentraciones se mantienen constantes a medida que aumenta la severidad, a excepción del caso de asma severa persistente en donde solo tenemos dos pacientes y la concentración de IL-10 aumenta de forma importante. Las diferencias no son significativas, este hallazgo no difiere al encontrado por Tomita y colaboradores⁹⁴ quienes no encontraron diferencias entre las concentraciones séricas de la IL-10 en sanos, asmáticos leves y asmáticos severos, en suero. Nosotros no encontramos correlación entre la IL-10 y el FEV₁, al igual que estos investigadores. Ni relación entre la IgE y la IL-10.

Al estudiar la relación de las citocinas con la edad en nuestros pacientes pudimos observar la tendencia que existe en el ser humano a tener mayores niveles de citocinas Th-2 a medida que pasamos el promedio de edad y envejecemos y de disminuir nuestras concentraciones de citocinas Th-1. Esto lo podemos observar en el hecho de que con la edad, los seres humanos tendemos a desarrollar un mayor número de enfermedades autoinmunes y a sufrir enfermedades, como las infecciosas, con un mayor grado de severidad que cuando se es joven.

La gran mayoría de los estudios sobre la patogénesis del asma se realizan en células de lavados broncoalveolares, en biopsias del epitelio bronquial o en células de sangre

periférica y las citocinas se miden por medio de la determinación de mRNA o por la determinación de las concentraciones intracelulares de las mismas. Estos estudios muestran los resultados después de estimular dichas células con antígenos de múltiples tipos. Son escasos los estudios en donde se determinaran las concentraciones de las citocinas en el suero.

CONCLUSIONES

1. No existen diferencias significativas entre las citocinas de los pacientes asmáticos alérgicos a los ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus* y *farinae*) y los controles sanos.
2. Hay diferencias significativas entre los diferentes grados de severidad del asma alérgica a los ácaros y la IL-13.
3. Solo la IL-4 muestra diferencias significativas con los diferentes grados de obstrucción y una correlación negativa con el VEF₁.
4. Existe una correlación inversa entre las citocinas Th-2/Th-1 aunque esta correlación no sea importante.
5. El VEF₁ se encuentra disminuido en los pacientes al comparársele con los controles sanos y no se encuentra influenciado por la edad, el sexo o e grado de severidad.
6. La inmunoglobulina E mostró diferencia significativa entre las concentraciones de los pacientes asmáticos atópicos y los controles sanos no atópicos. Esta diferencia no influyó en los grados de obstrucción, severidad o el VEF₁.
7. La edad puede influenciar las concentraciones de citocinas a medida envejecemos.

8. La posible explicación de la diferencia entre nuestros hallazgos y los descritos en la literatura se puede deber a que nuestros pacientes se encontraban asintomáticos a la hora de la toma de la muestra, al tamaños de la muestra ya que a pesar de que fueron 38 pacientes y 19 controles sanos al dividirlos por los grados de severidad o por el tipo de obstrucción se dispersan mucho por grupos, a que la técnica utilizada no haya sido la más adecuada, a la gran variabilidad que observamos entre los controles sanos, a que la vida media de las citocinas sea muy pequeña o que la afinidad de los receptores para las misma sea tan alta que el tiempo que las citocinas pasan en el plasma sea muy pequeño.

TABLA 1



CLASIFICACIÓN DE SEVERIDAD

Clasificación de la Severidad
Características Clínicas Antes de Tratamiento

	Síntomas	Síntomas Nocturnos	FEV ₁ or PEF
PASO 4 Severa Persistente	Continuos Actividad física limitada	Frecuentes	< 60% predicho Variabilidad > 30%
PASO 3 Moderada Persistente	Díarios Ataques afectan la actividad	> 1 vez a la semana	60 - 80% predicho Variabilidad > 30%
PASO 2 Leve Persistente	> 1 vez a la semana pero < 1 vez al día	> 2 veces al mes	< 80% predicho Variabilidad 20 - 30%
PASO 1 Intermitente	< 1 vez a la semana Asintomático y PEF normal entre ataques	< 2 veces al mes	> 80% predicho Variabilidad < 20%

La presencia de una característica de severidad es suficiente para clasificar al paciente en esa categoría.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 1. Concentraciones Séricas (pg/ml) de las Citocinas en Pacientes y Controles Sanos

	SANOS			PACIENTES			
	MEDIANA	Q ₂₅	Q ₇₅	MEDIANA	Q ₂₅	Q ₇₅	P
IL-4	3.83	1.72	14.09	2.76	0.00	13.08	= 0.512
IL-10	36.85	15.3	67.23	14.93	0.00	373.95	= 0.925
IL-13	623.88	101.92	1595.82	822.50	58.00	1550.67	= 0.847
IL-12p70	120.5	67.08	206.56	129.34	65.58	198.89	= 0.640
IFN- γ	21.4	13.1	29.77	19.00	8.32	28.42	= 0.848
TNF- α	< 7.8			< 7.8			

Cuadro 2. Concentración Sérica (pg/ml) de las Citocinas, IgE y VEF₁ por Severidad según GINA

SEVERIDAD DEL ASMA CLASIFICACIÓN GINA Y SANOS	PG/ML	IL-10	IL-4	IL-13	IL-12P70	IFN- γ	NIVEL SÉRICO IGE (UI/ML)	VEF1 (%)
SANOS	Promedio	44.57	8.06	947.91	139.94	32.80	35.17	106.47
	Mediana	36.85	3.83	623.88	120.50	21.40	33.50	108.09
ALI (Asma Leve Intermittente)	Promedio	41.04	1.83	1533.22	139.94	23.30	783.00	104.33
	Mediana	.00	.51	1492.88	110.06	23.44	783.00	97.00
ALP (Asma Leve Persistente)	Promedio	171.18	6.63	985.89	185.51	36.16	299.25	95.56
	Mediana	41.85	6.64	500.34	172.48	22.92	259.00	91.00
AMP (Asma Moderada Persistente)	Promedio	276.00	14.53	729.25	137.19	22.45	767.03	84.26
	Mediana	10.70	2.22	536.50	125.54	14.87	496.40	85.85
ASP (Asma Severa Persistente)	Promedio	307.45	3.43	1570.78	78.74	28.15	682.67	73.00
	Mediana	371.31	3.12	1581.34	81.40	30.74	114.00	73.00

Cuadro 3. Concentración Sérica (pg/ml) de las Citocinas, IgE y VEF₁ por Grado de Obstrucción de la Vía Aérea de Mediano Calibre

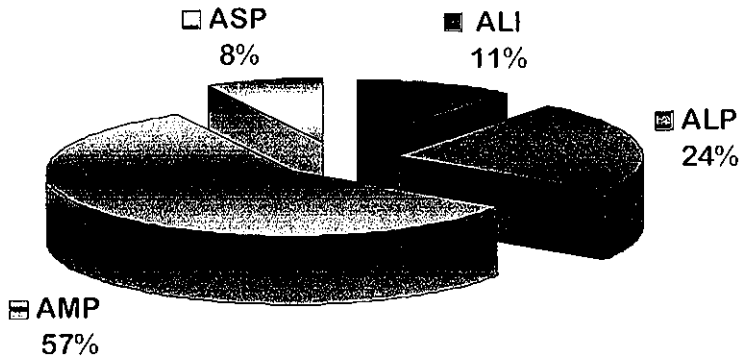
GRADO DE OBSTRUCCIÓN		IL-10	IL-4	IL-13	IL-12P70	IFN- γ	NÍVEL SÉRICO IGE (UI/ML)	VEF1(%)
Normal	Promedio	44.39	7.16	960.16	106.07	34.26	327.43	108.95
	Mediana	30.51	3.52	623.88	90.44	20.41	36.00	110.13
Leve	Promedio	39.56	13.81	958.09	161.37	28.53	190.00	110.07
	Mediana	27.24	13.96	991.05	153.66	27.38	190.00	107.50
Moderada	Promedio	166.48	3.13	1043.34	130.49	19.15	394.54	95.48
	Mediana	19.69	.47	763.00	118.07	16.22	259.00	94.00
Importante	Promedio	420.49	19.70	1058.72	189.73	50.18	1461.00	82.50
	Mediana	90.89	11.46	822.50	170.39	22.92	1387.00	81.00
Muy Importante	Promedio	201.36	17.95	672.25	138.33	13.49	657.20	63.81
	Mediana	1.89	3.37	244.26	114.85	8.50	558.00	63.00

Cuadro 4. Concentración Sérica (pg/ml) de las Citocinas, IgE y VEF₁ por Grado de Obstrucción de la Vía Aérea de Pequeño Calibre

GRADO DE OBSTRUCCIÓN		IL-10	IL-4	IL-13	IL-12P70	IFN- γ	NÍVEL SÉRICO IGE (UI/ML)	VEF1(%)
Normal	Promedio	44.94	6.59	947.17	115.57	36.34	33.00	109.79
	Mediana	30.51	3.52	623.88	107.41	20.61	31.00	110.13
Leve	Promedio	35.23	16.32	1610.17	135.07	24.59	46.00	105.44
	Mediana	36.85	21.02	1619.26	90.40	18.38	46.00	99.27
Moderada	Promedio	90.35	4.76	965.96	137.05	20.53	601.78	100.23
	Mediana	6.62	1.15	763.00	149.48	21.88	281.00	99.50
Importante	Promedio	270.34	2.12	1118.07	147.81	21.13	896.35	87.20
	Mediana	41.85	.73	1303.00	145.37	15.96	366.70	85.00
Muy Importante	Promedio	504.06	18.11	806.24	149.78	45.03	1005.75	76.36
	Mediana	371.31	9.88	524.46	114.85	21.02	972.50	75.00
Grave	Promedio	17.46	28.85	711.53	173.37	11.92	287.00	62.43
	Mediana	.00	15.69	469.60	192.27	12.28	243.00	60.00

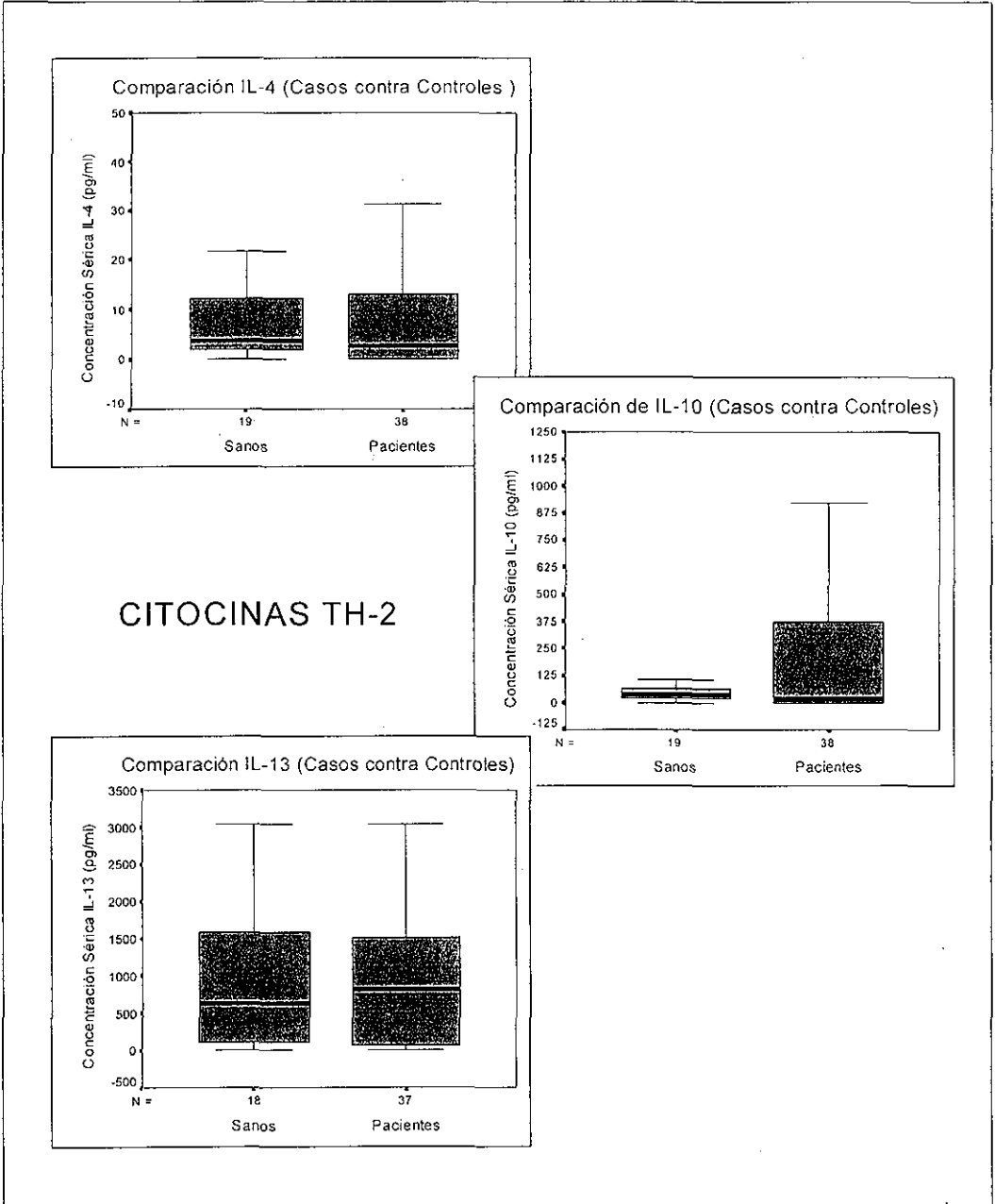
Gráfico 1.

PORCENTAJE DE PACIENTES DE ACUERDO A LA CLASIFICACIÓN DE SEVERIDAD GINA



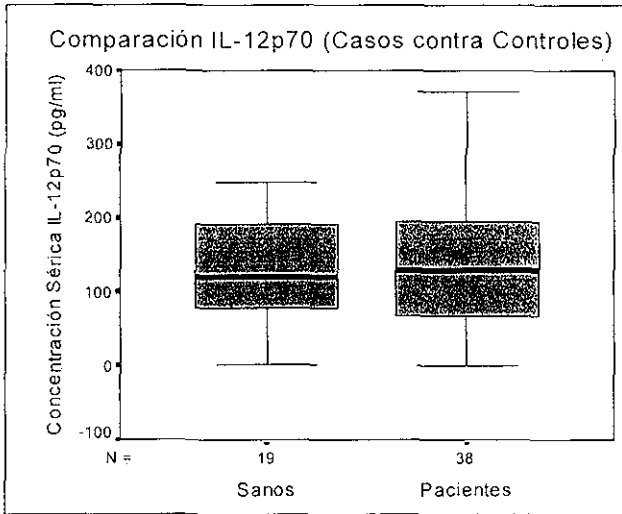
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1. Concentraciones Séricas de las Citocinas en Pacientes y Controles Sanos

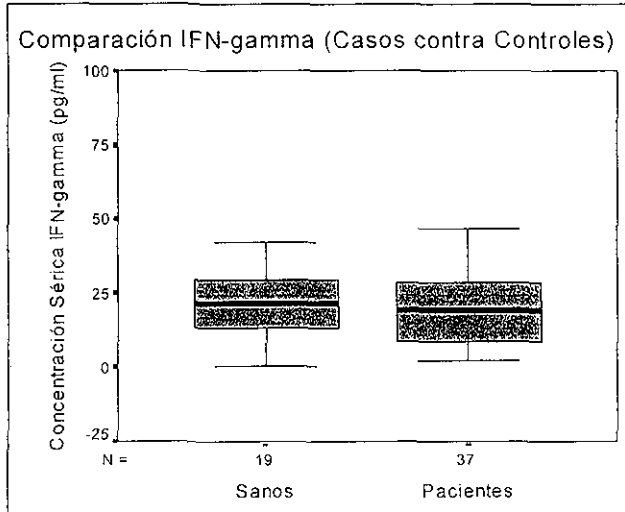


**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 2. Concentraciones Séricas de las Citocinas en Pacientes y Controles Sanos

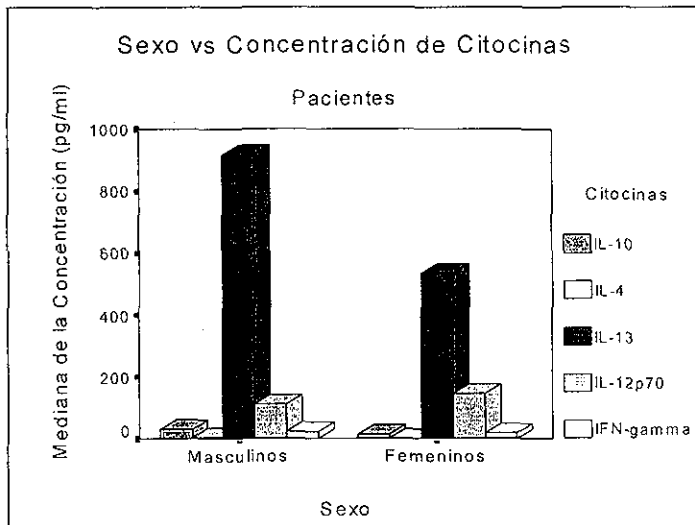
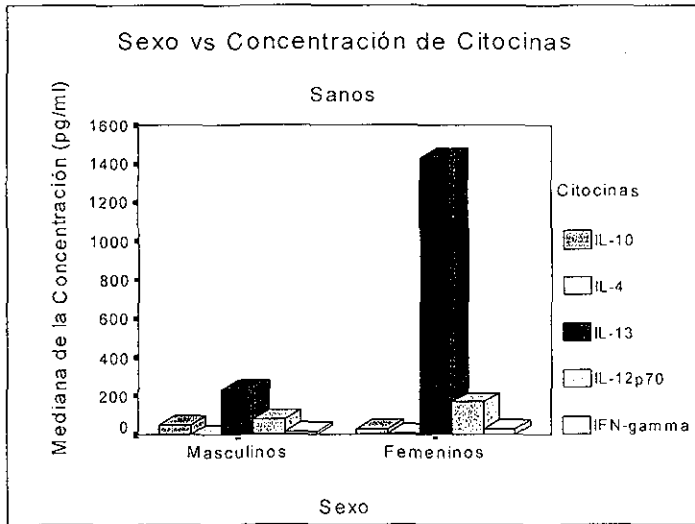


CITOCINAS TH-1



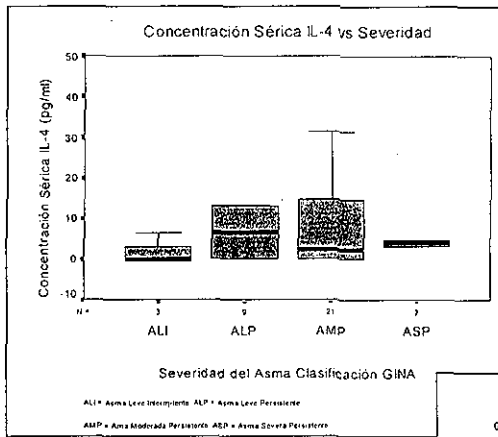
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 3. Concentración de las Citocinas por Sexo

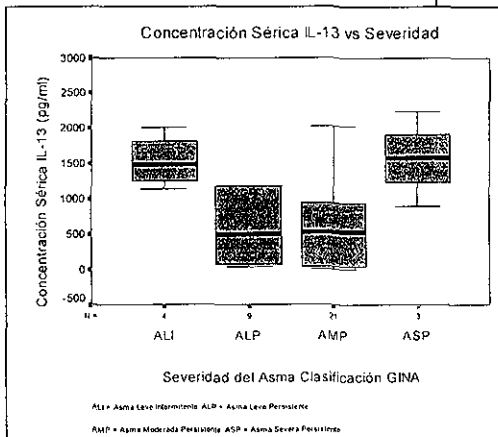
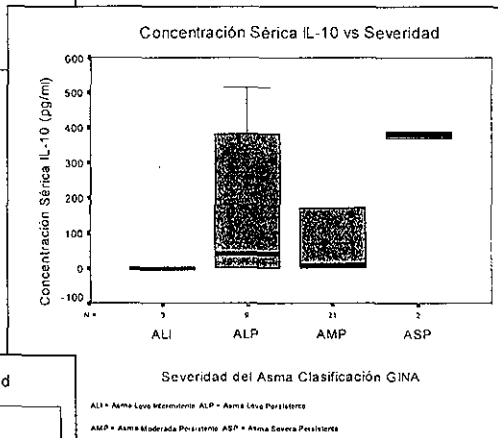


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4. Citocinas vs Severidad del Asma Según GINA

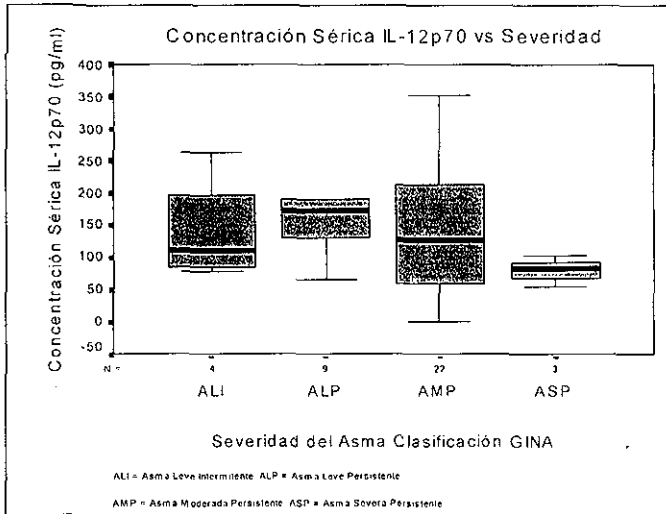


CITOCINAS TH-2

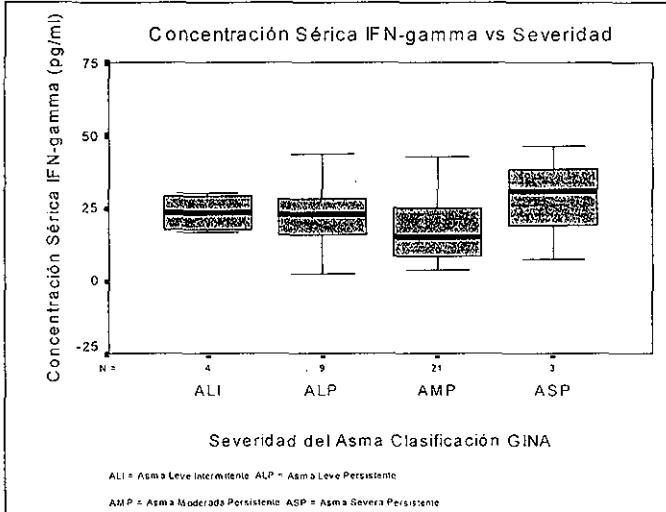


TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 5. Citocinas vs Severidad del Asma Según GINA

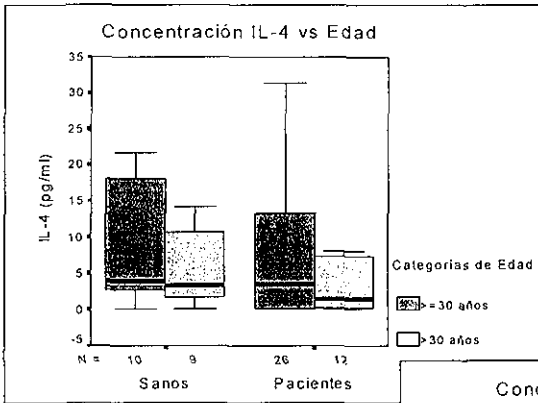


CITOCINAS TH-1

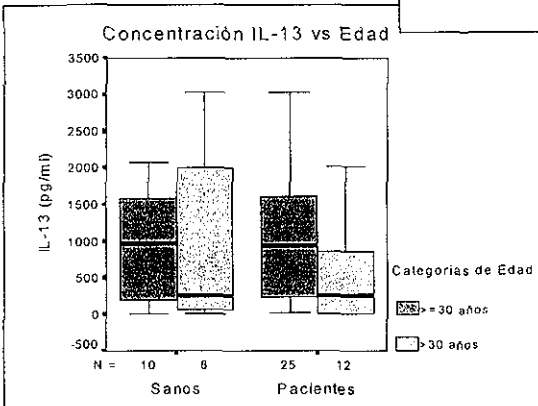
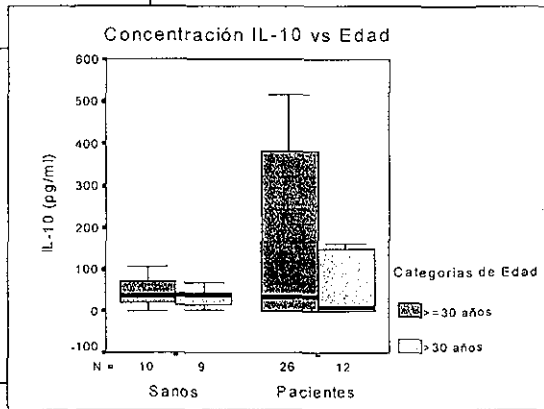


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 6. Concentración Sérica de las Citocinas por Categoría de Edad



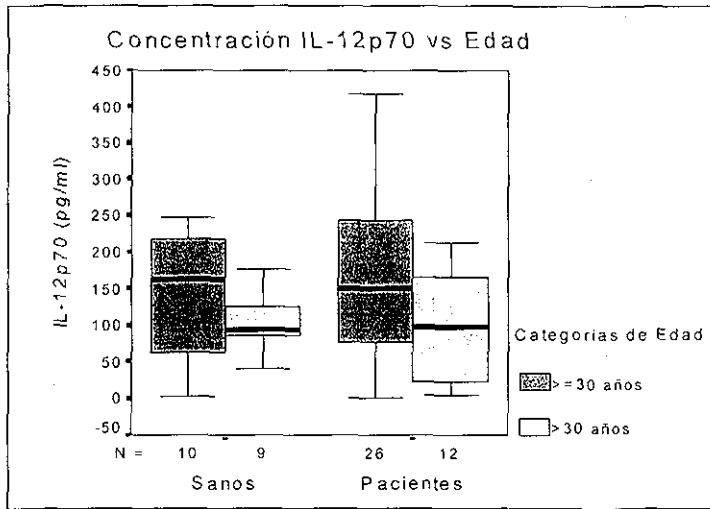
CITOCINAS TH-2



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

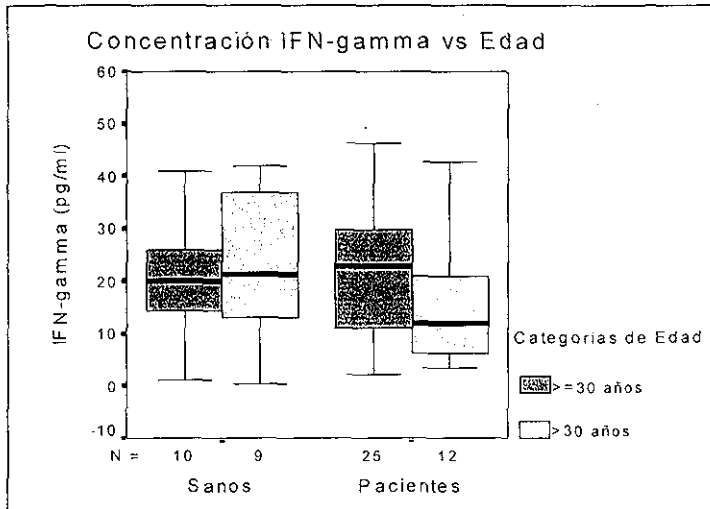
Figura 7. Concentración Sérica de las Citocinas por Categoría de Edad

a-)



CITOCINAS TH-1

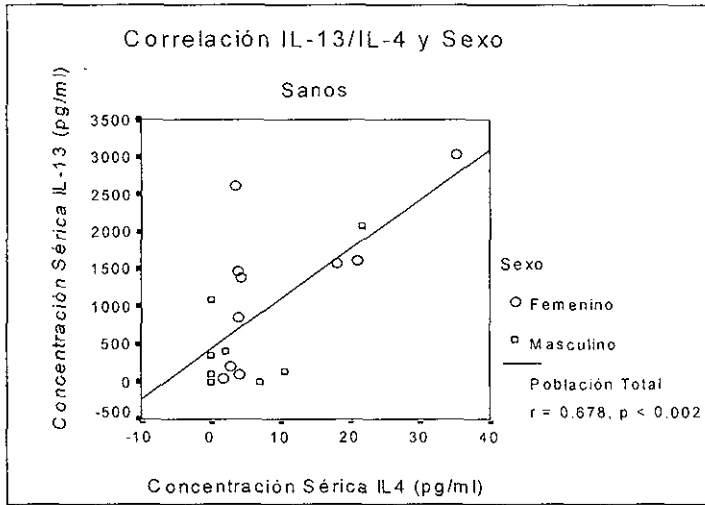
b-)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

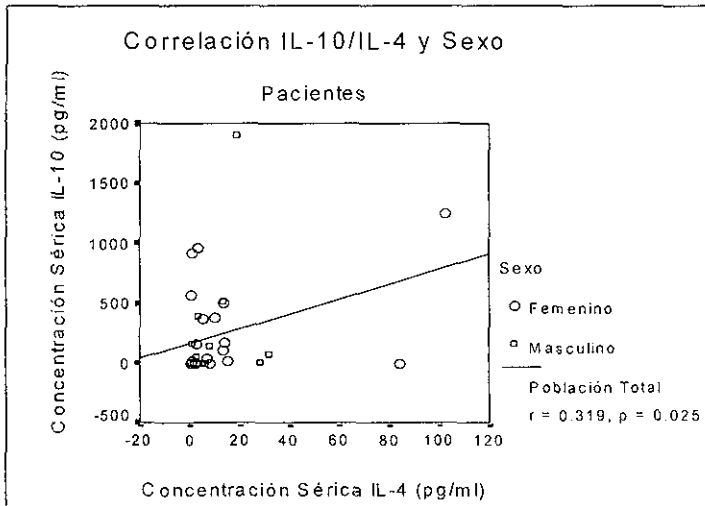
Figura 8. Correlaciones entre Citocinas TH-2 y TH-1

a-)



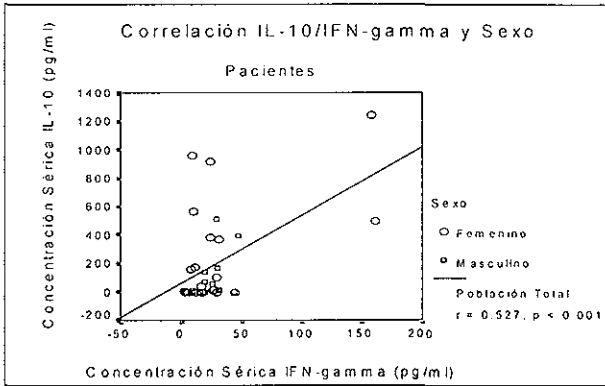
CORRELACIONES

b-)

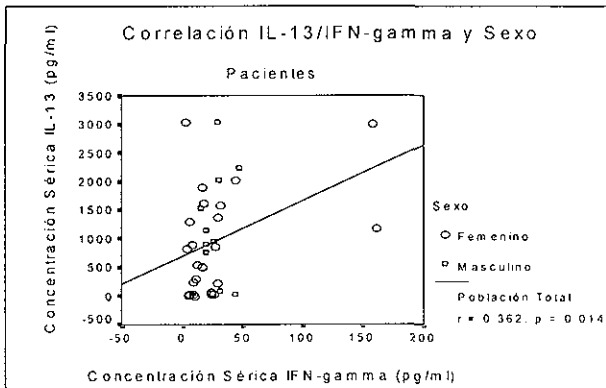
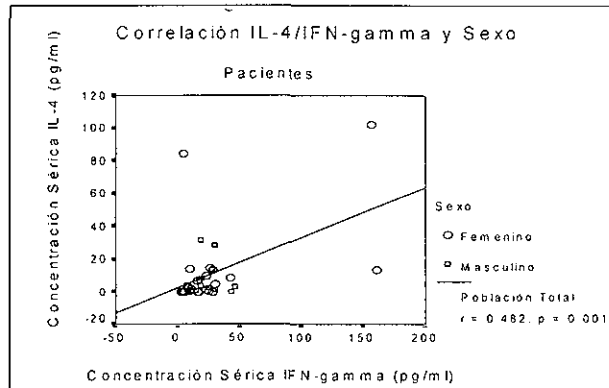


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 9. Correlación entre las Citocinas TH-2 y TH-1



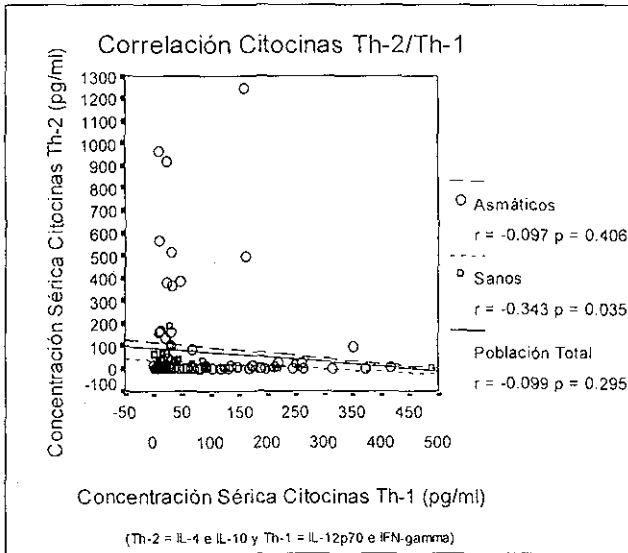
C
O
R
R
E
L
A
C
I
O
N
E
S



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

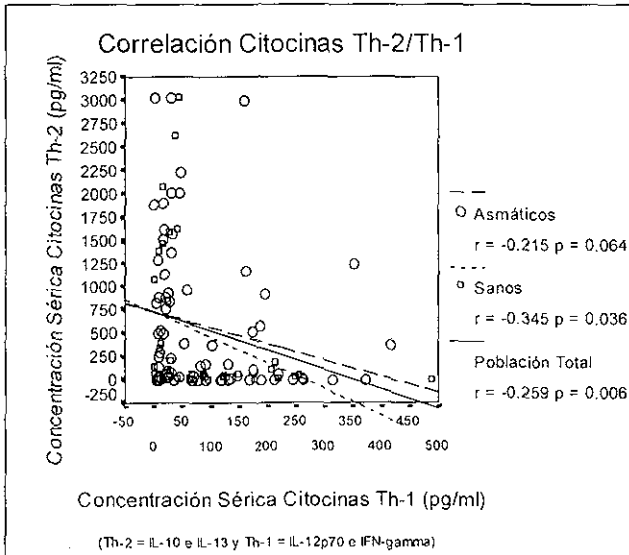
Figura 10. Correlaciones entre las Citocinas Th-2/Th-1

a-)



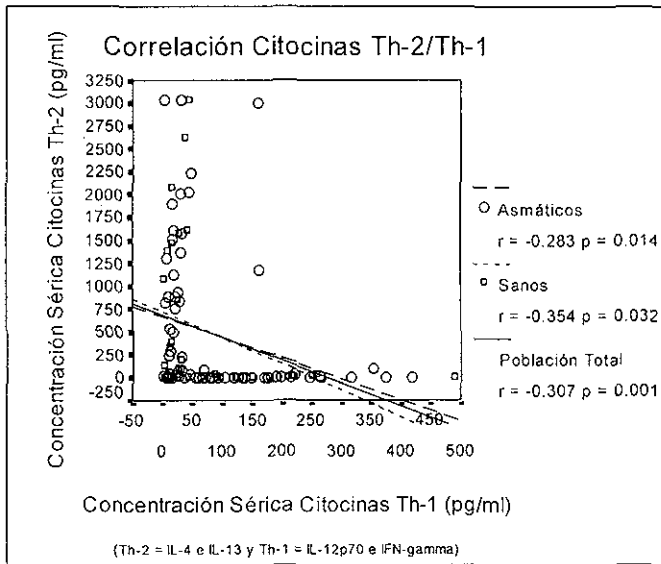
CORRELACIONES

b-)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

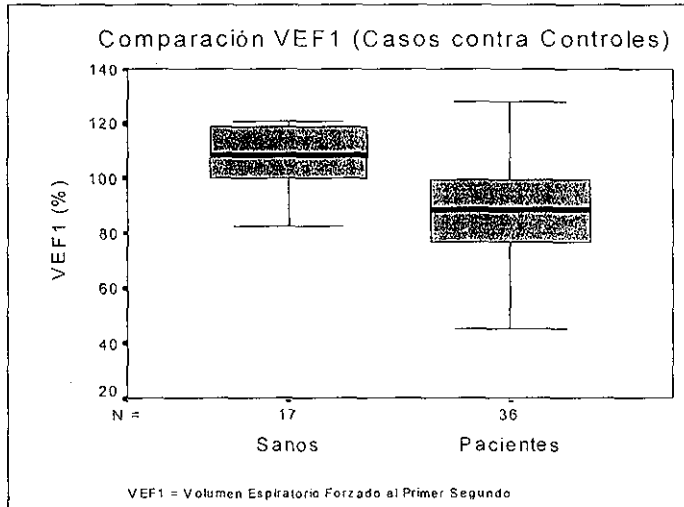
Figura 11. Correlaciones entre las Citocinas Th-2/TH-1



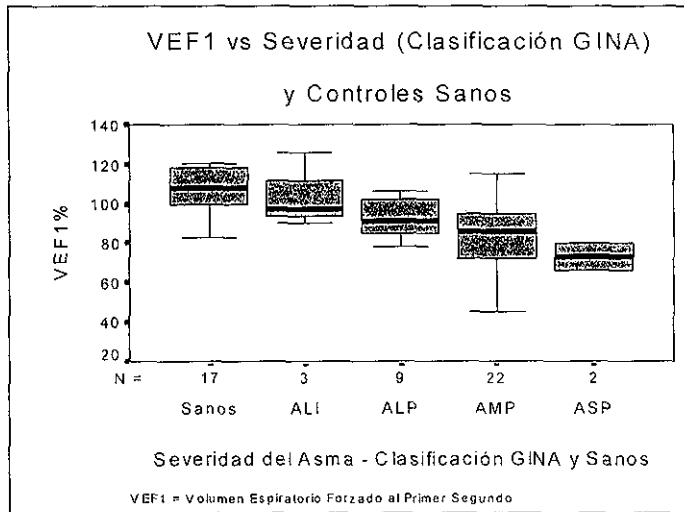
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 12. Comparaciones del VEF1

a-)



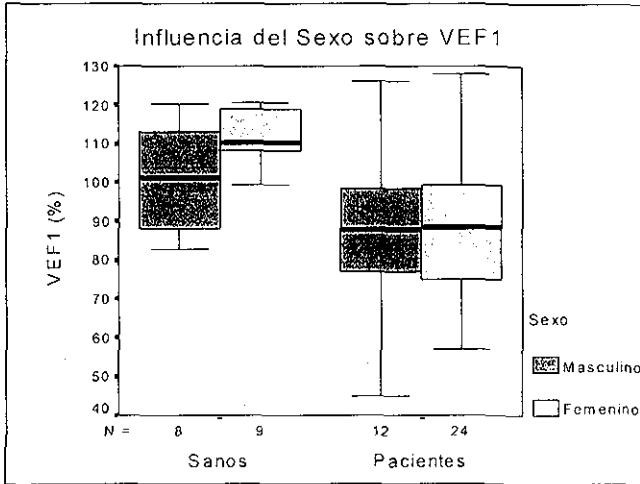
b-)



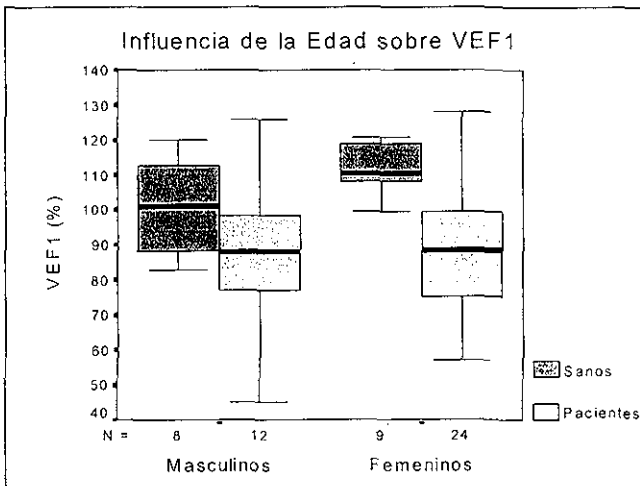
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 13. Correlación del VEF1, Sexo e IL-4

a-)

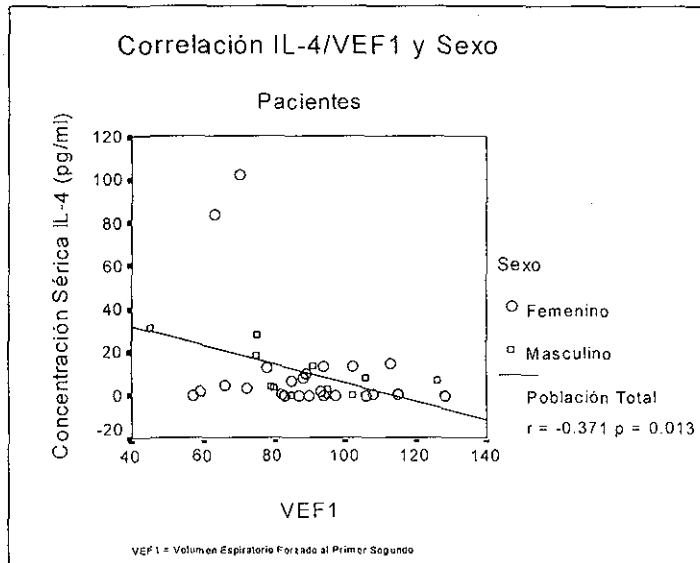


b-)



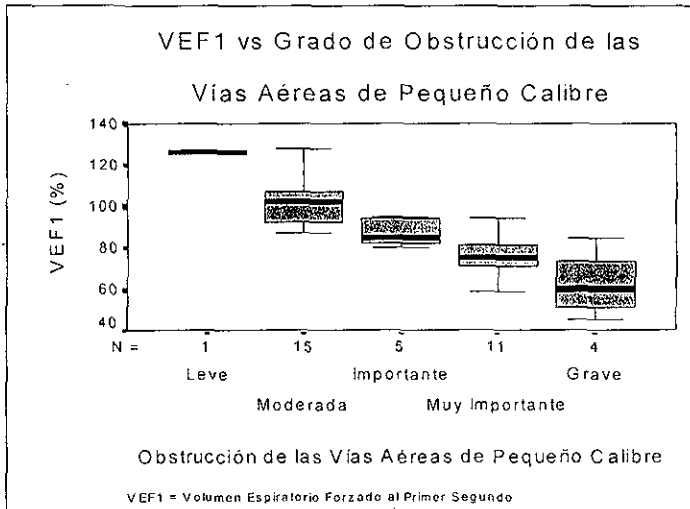
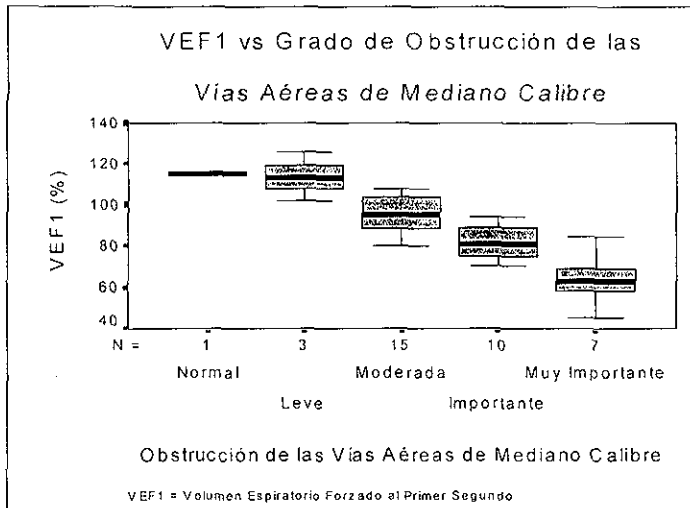
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 14. Correlación entre la IL-4 y el VEF1



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

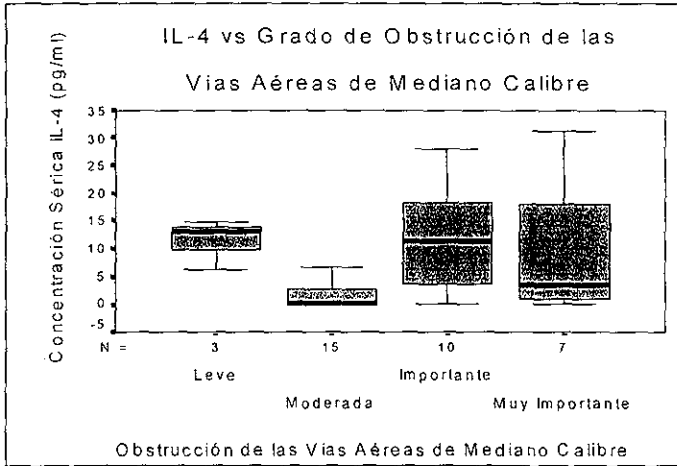
Figura 15. Comparación del VEF1 y el Grado de Obstrucción de las Vías Aéreas



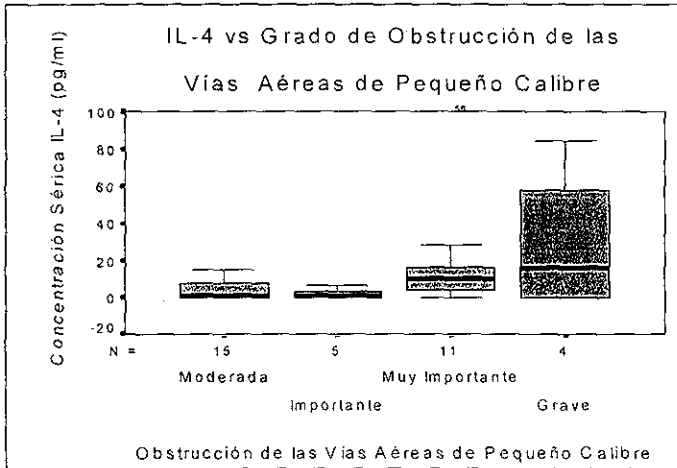
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 16. Comparación del la IL-4 y el Grado de Obstrucción de las Vías Aéreas

a-)



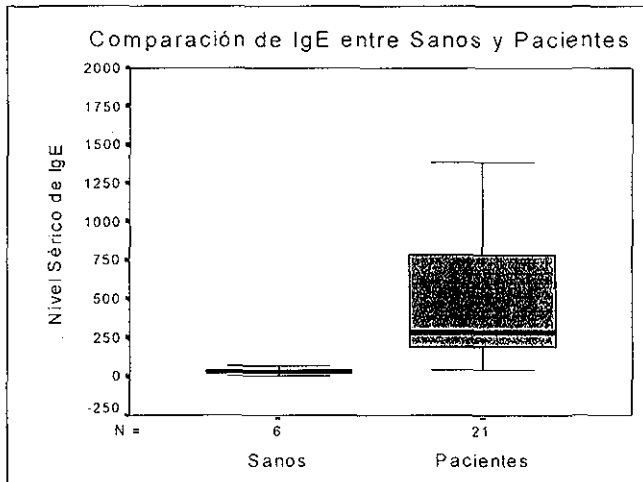
b-)



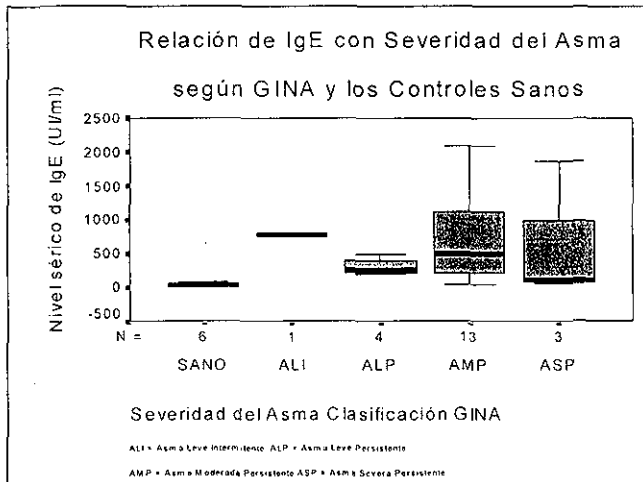
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 17. Comparaciones IgE con Controles Sanos, Paciente y Severidad del Asma (GINA)

a-)

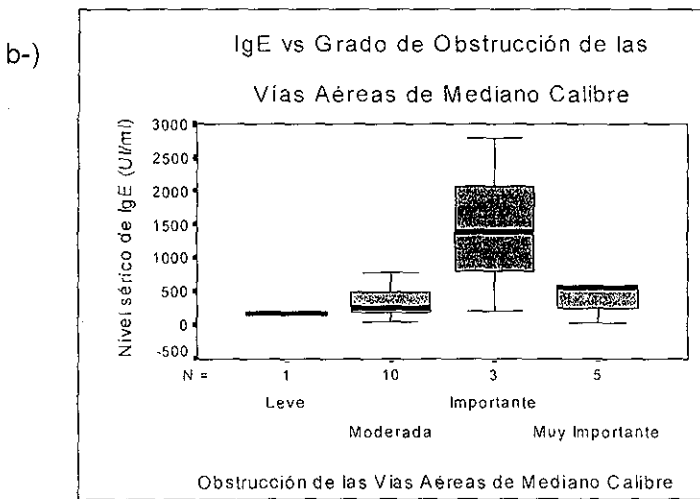
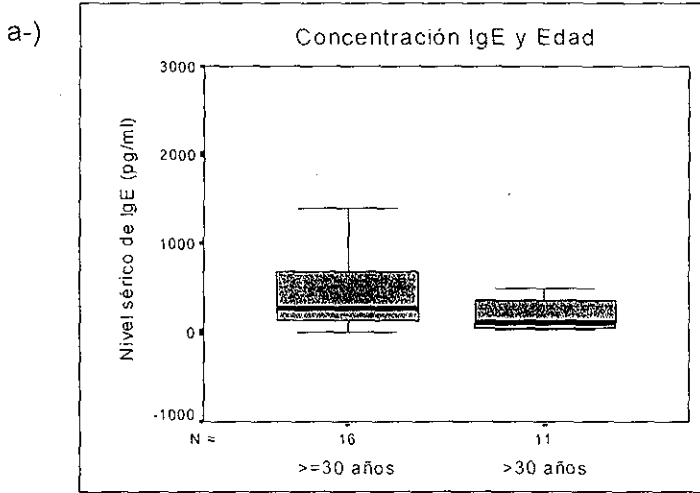


b-)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

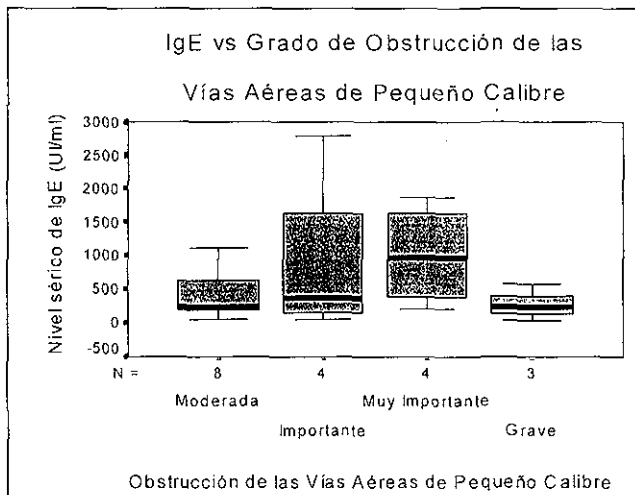
Figura 18. Comparación IgE, Edad y Obstrucción de las Vías Aéreas



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Figura 19. Comparación IgE con Obstrucción de las Vías Aéreas



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Maddox L, Schwartz D. The Pathophysiology of asthma. *Annu. Rev. Med.* 2002;3:477-498.
- 2- Busse WW, Horwitz RJ, Reed ChE. Asthma in adults. In: Middleton E, Reed ChE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW. *Allergy Principles and Practice*. fifth ed. Missouri: Mosby; 1998. 838-858.
- 3- National Heart, Blood and Lung Institute. Global strategy for asthma management and prevention. WHO/NHLBI workshop report, publication no. Bethesda, MD: National Institute of Health, 2002.
- 4- National Heart, Blood and Lung Institute. Expert Panel Report 2: guidelines for the management of asthma, publication no. 97-4051. Bethesda, MD: National Institute of Health, 1997.
- 5- Naclerio RM, Baroody F. Understanding the inflammatory processes in upper allergic airway disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101 Suppl 2:345-351.
- 6- Holgate ST. The inflammation-repair cycle in asthma: the pivotal role of the epithelium. *Clin and Exp Allergy* 1998; 28 Suppl 5:97-103.
- 7- Hamid QA, Minshall EM. Molecular pathology of allergic disease I: Lower airway disease *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:20-36.
- 8- Lemanske RF, Busse WW. Asthma. *JAMA* 1997;278:1855-1873.
- 9- Peat JK, Li J. Reversing the trend: Reducing the prevalence of asthma. *Allergy Clin Immunol* 1999;103:1-10.
- 10-Sly RM. Changing prevalence of allergic rhinitis and asthma. *Ann Allergy Asthma*

- Immunol 1999;82:233-252.
- 11-The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. Lancet 1998;351:1225-32.
 - 12-Taylor WR, Newacheck PW. Impact of childhood asthma on health. Pediatrics 1992;90:657-662.
 - 13-Fagan JK, Scheff PA, et al. Prevalence of asthma and other allergic diseases in an adolescent population: association with gender and RACE. Ann Allergy Asthma Immunol 2001;86:177-184.
 - 14-González JG. Simposio sobre el manejo de la enfermedad asmática. El papel de la normativa sobre asma: una visión desde México. Allergy Asthma Proc 2000;14:24-25.
 - 15-Canseco C, Leal L, Mora H, Galindo G. Epidemiología de las enfermedades alérgicas en el área metropolitana de Monterrey. Rev Alerg Mex 1991;38:95-101.
 - 16-González JG, Becerra LE, Arévalo MA. Prevalencia del asma bronquial en población escolar en la ciudad de Guadalajara, Jal. México. Rev Alerg Mex 1992;39:3-7.
 - 17-Vargas MH, Sienna JJ, Diaz-Mejía GS, Olvera-Castillo R, León González MD. Aspectos epidemiológicos del asma infantil en México. Gac Med Mex 1994;132:255-265.
 - 18-Barraza-Villarreal A, Sanín-Aguirre LH y cols. Prevalencia de asma y otras enfermedades alérgicas en niños escolares de Ciudad Juárez, Chihuahua. Salud Pública Mex 2001;433-443.
 - 19-O'Byrne PM, Inman MD. The clinical expression of allergy in the lungs. Allergy 1999;54:7-14.
 - 20-Finkelman FD, Urban JF. The other side of the coin: The protective role of the Th2

- cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:772-80.
- 21-Christodoulopoulos P, Cameron L, Durham S. Molecular pathology of allergic disease II: Upper airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:211-23.
- 22-Liew FY. T_H1 and T_H2 cells: a historical perspective. *Nature Rev* 2002;2:55-60.
- 23-Kourilsky P, Paolo TB. Cytokine fields and the polarization of the immune response. *Trends Immunol* 2001;22:502-509.
- 24-O'Garra A, Arai N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol* 2000;10:542-550.
- 25-Wong CK, Ho CY, KO FWS, et al. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10, and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol* 2001;125:177-183.
- 26-Bettiol J, Bartsch P, Louis R et al. Cytokine production from peripheral whole blood in atopic and nonatopic asthmatics: relationship with blood and sputum eosinophilia and serum IgE levels. *Allergy* 2000;55:1134-1141.
- 27-Romagnani S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Molecular Immunol* 2002;38:881-885.
- 28-Romagnani S. The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:399-408.
- 29-Braun A, Lommatzsch M and Renz H. The role of neurotrophins in allergic bronchial asthma. *Clin and Exp Allergy* 2000;30:178-186.
- 30-Los H, Koppelman G, Postma D. The importance of genetic influences in asthma. *Eur Respir J* 1999;14:1210-27.
- 31-Barnes KC. Atopy and asthma genes – where do we stand? *Allergy* 2000;55:803-817.

- 32-Barnes KC. Evidence for common genetic elements in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:S192-200.
- 33-Daser A, Daheshia M and De Sanctis GT. Genetics of allergen-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:167-174.
- 34-Hall IP. Genetic factors in asthma severity. *Clin and Exp Allergy* 1998;28 Suppl 5:16-20.
- 35-Martinez FD. Gene by environment interactions in the development of asthma. *Clin and Exp Allergy* 1998;28 Suppl 5:21-25.
- 36-Graseman H, Yandava CN, Drazen JM. Neuronal NO synthase (NOS1) is a major candidate gene for asthma. *Clin and Exp Allergy* 1999;29(4):39-41.
- 37-Barnes KC. Gene-environment and gene-gene interaction studies in the molecular genetic analysis of asthma and atopy. *Clin and Exp Allergy* 1999;29(4):47-51.
- 38-Kauffmann F, Dizier MH, et al. EGEA (Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy) – descriptive characteristics. *Clin and Exp Allergy* 1999;29(4):17-21.
- 39-Asher I, Dagli E, Holgate S. Genetic and Environmental Influences. Prevention of Allergy and Asthma Interim Report. *Allergy* 2000;55:1074-1075.
- 40-von Mutius E. The environmental predictors of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:9-19.
- 41-Björkstén B, Sepp E, Julge K, et al. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:515-520.
- 42-Folkerts G, Busse W, Nijkamp F, et al. State of the art: virus-induced airway hyperresponsiveness and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1708-20.
- 43-Wills-Karp M, Santeliz J and Karp Ch. The germless theory of allergic disease:

- revisiting the hygiene hypothesis. *Nature Rev Immunol* 2001;1:69-75.
- 44-Herz U, Lacy P, Renz H and Erb K. The influence of infections on the development and severity of allergic disorders. *Curr Opin Immunol* 2000;12:632-640.
- 45-Folkerts G, Walzl G, Openshaw PJM. Do common childhood infections 'teach' the immune system not to be allergic? *Immunol Today* 2000;21:118-120.
- 46-Gern JE and Busse WW. Relationship of viral infections to wheezing illnesses and asthma. *Nature Rev Immunol* 2002;2:132-138.
- 47-Okudaira H, Shuto H, Shuto C, et al. A shadow of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of atopic diseases. *Clin Exp Allergy* 2001;31:18-24.
- 48-Paunio M, Heinonen O, et al. Measles History and Atopic Diseases. *JAMMA* 2000;283:343-346.
- 49-Avila PC. Interactions between allergic inflammation and respiratory viral infections. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:829-31.
- 50-Mygind N, Gwaltney JM, Winther B, Owen-Hendley J. The common cold and asthma. *Allergy* 1999;54 Suppl 57:146-159.
- 51-Lau S, Illi S, Sommerfeld Ch, et al. Early exposure to house-dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study. *Lancet* 2000;356:1392-97.
- 52-Strachan DP. The role of environmental factors in asthma. *British Medical Bulletin* 2000;56:865-882.
- 53-O'Halloren MT, Yunginger JW, Offord KP, et al. Exposure to an aeroallergen as a possible precipitating factor in respiratory arrest in young patients with asthma. *N Engl J Med* 1991;325:206-8.
- 54-Alp H, Yu B, et al. Cockroach allergy appears early in life in inner-city children with recurrent wheezing. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;86:51-54.

- 55-Arlan LG, Neal JS, et al. Distribution and removal of cat, dog and mite allergens on smooth surfaces in homes with and without pets. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;87:296-302.
- 56-Platts-Mills TAE, et al. The role of intervention in established allergy: Avoidance of indoor allergens in the treatment of chronic allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:787-804.
- 57-Targonski PV, Persky VW, Ramekrishnan V. Effect of environmental moulds on risk of death from asthma during the pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:955-961.
- 58-Epton MJ, Martin IR, Graham P et al. Climate and aerollergen levels in asthma: a 12 month prospective study. *Thorax* 1997;52:528-34.
- 59-Weiss ST. Environmental risk factors in childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 1998;28(5):29-34
- 60-Devalia JL, Bayram H, Rusznak C, et al. Mechanism of pollution-induced airway disease: *in vitro* studies in the upper and lower airways. *Allergy* 1997;52(38):45-51.
- 61-Diaz-Sanchez D, Penichet-Garcia M, Saxon A. Diesel exhaust particles directly induce activated mast cells to degranulate and increase histamine levels and symptom severity. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:1140-6.
- 62-Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu SI, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997;275:77-79.
- 63-Weiss ST. Parasites and asthma/allergy: What is the relationship? *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:205-10.
- 64-Yazdanbakhsh M, van den Biggelaar A, Maizels RM. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends Immunol* 2001;22:372-77.

- 65-Jones CA, Holloway JA, Warner JO. Does atopic disease start in foetal life? *Allergy* 2000;55:2-10.
- 66-Schatz M. Interrelationships between asthma and pregnancy: A literature review. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103 Suppl 2:330-6.
- 67-Jankovic D, Liu A, Gause W. Th1 and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol* 2001;22:450-7.
- 68-Spellberg B, Edwards JE. Type 1/Type 2 Immunity in infectious diseases. *CID* 2001;32:76-102.
- 69-Reed ChE, Milton DK. Endotoxin-stimulated innate immunity: A contributing factor for asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:175-66.
- 70-Martinez FD, Stern DA, Wright AL, et al. Differential immune responses to acute lower respiratory illness in early life and subsequent development of persistent wheezing and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:915-20.
- 71-White M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:S378-81.
- 72-Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology* 4th Ed. Saunders; 2000:236-267.
- 73-Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994;12:227-57.
- 74-Kay AB. Allergy and Allergic Disease (1st part). *N Engl J Med* 2001;344(1)30-37.
- 75-Kay AB. Allergy and Allergic Disease (2nd part). *N Engl J Med* 2001;344(2)109-112.
- 76-O'Byrne PM, Inman MD, Parameswaran K. The trials and tribulation of IL-5, eosinophils, and allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:503-8.
- 77-Enerbäck L. The differentiation and maturation of inflammatory cells involved in the

- allergic response: mast cells and basophils. *Allergy* 1997;52:4-10.
- 78-Hughes JM, Rimmer SJ, et al. Eosinophilia, interleukin-5, and tumour necrosis factor-alpha in asthmatic children. *Allergy* 2001;56:412-418.
- 79-Sampson AP. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp Allergy* 2000;30(1):22-27.
- 80-Busse WW, Banks-Schlegel S. Pathophysiology of severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:1033-42.
- 81-Stirling RG, Chung KF. Severe asthma: definition and mechanisms. *Allergy* 2001;56:825-840.
- 82-Reider N, Reide D, et al. Dendritic cells contribute to the development of atopy by an insufficiency in IL-12 production. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:89-95.
- 83-Busse WW. Inflammation in asthma: the cornerstone of the disease and target of therapy. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102 Suppl 4:17-S22.
- 84-Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *N Engl J Med* 2001;344(5):350-362.
- 85-Bochner BS. Road signs guiding leukocytes along the inflammation superhighway. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:817-28.
- 86-Molet S, Hamid Q, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblast to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:430-8.
- 87-Tournoy KG, Kips JC, Pauwels RA. Counterbalancing of Th2-driven allergic airway inflammation by IL-12 does not require IL-10. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:483-91.
- 88-Oettgen HC. Regulation of the IgE isotype switch: new insights on cytokine signals and the functions of ϵ germline transcripts. *Current Opin Immunol* 2000;12:618-623.
- 89-Sherrill DL, Stein R, et al. Total serum IgE and its association with asthma symptoms

- and allergic sensitization among children. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:28-36.
- 90-Durham SR, Till SJ, Corrigan ChJ. T lymphocytes in asthma: Bronchial versus peripheral responses. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:S221-6.
- 91-Yunginger JW, Ahlstedt S, Eggleston PA, et al. Quantitative IgE antibody assays in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:1077-84.
- 92-Lammas DA, Casanova JL, Kumararatne DS. Clinical consequences of defects in the IL-12-dependent IFN- γ pathway. *Clin Exp Immunol* 2000;121:417-425.
- 93-Kondo N, Matsui E, et al. Atopy and mutations of IL-12 receptor β 2 chain gene. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1189-1193.
- 94-Tomita K, Lim S, et al. Attenuated Production of Intracellular IL-10 and IL-12 in Monocytes from Patients with Severe Asthma. *Clin Immunol* 2002;102(3):258-266.
- 95-Kimura M, Tsuruta S, Yoshida T. IL-4 production by PBMCs on stimulation with mite allergen is correlated with the level of serum IgE antibody against mite in children with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:327-332.
- 96-Arshad SH, Holgate S. The role of IgE in allergen-induced inflammation and the potential for intervention with a humanized monoclonal anti-IgE antibody. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1344-1351.
- 97-Fahy JV Reducing IgE levels as a strategy for the treatment of asthma *Clin Exp Allergy* 2000;30 Supp1:16-21.
- 98-Oettgen HC, Geha RS. IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:429-40.
- 99-Nasser T, Minshall EM, et al. Expression of IL-12 and IL-13 mRNA in asthma and their modulation in response to steroid therapy. *Am J Respir Crit Care M* 1997;155:845-51.

- 100- Humbert M, Durham SR, Kimmit P, et al. Elevated expression of messenger ribonucleic acid encoding IL-13 in bronchial mucosa of atopic and nonatopic subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:657-65.
- 101- Ford JG, Rennick D, Donaldson DD, et al. IL-13 and IFN- γ : interactions in lung inflammation. *J Immunol* 2001;167:1769-1777.
- 102- Shirakawa T, Deichmann KA, Izuhara K, et al. Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signaling. *Immunol Today* 2000;21:60-64.
- 103- Komai-Koma M, McKay A, Thomson L, et al. Immuno-regulatory cytokines in asthma: IL-15 and IL-13 in induced sputum. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1441-1448.
- 104- Brombacher K. The role of interleukin-13 in infectious diseases and allergy. *BioEssays* 2000;22:646-656.
- 105- Pope SM, Brandt EB, Mishra A, et al. IL-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an IL-5 and eotaxin dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:594-601.
- 106- Jiang H, Harris MB, Rothman P. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:1063-1070.
- 107- Fort MM, Cheung J, Yen D, et al. IL-25 induces IL-4, IL-5 and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 2001;15:985-995.
- 108- Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, et al. Interleukin IL-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998;282:2258-2261.
- 109- Grünig G, Warnock M, Wakit AE, et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 1998;282:2261-2263.
- 110- Grünig G, Ford JG et al. Roles of IL-13 and Interferon- γ in lung inflammation. *CHEST*

- 2002;121:88S.
- 111- Waiter DM, McIntire JJ, Berry G, et al. Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hiperreactivity. *J Immunol* 2001;167:4668-4675.
- 112- Moore PE, Church TL, Chism DD, Panettieri RA, Shore SA. IL-13 and IL-4 cause eotaxin release in human airway smooth muscle cells: a role for ERK. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;L847-L853.
- 113- Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C and Dekruyff RH. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nature* 2002;3:715-720.
- 114- Corry D. IL-13 in allergy: home at last. *Curr Op Immunol* 1999;11:610-614.
- 115- Wills-Karp M. IL-12/IL-13 axis in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:9-18.
- 116- Hoshino T, Winkler-Pickett RT, Mason AT, Ortaldo JR, Young HA. IL-13 production by NK cells: IL-13-producing NK and T cells are present in vivo in the absence of IFN- γ . *J Immunol* 1999;162:51-59.
- 117- Borish L, Aarons A, Rumblyrt J, et al. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:1288-96.
- 118- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interlekin-10 and Interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.
- 119- Matsumoto K, Gauvreau GM, et al. IL-10 production in circulating T cells differs between allergen-induced isolated early and dual asthmatic responders. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:281-6.
- 120- Covalita AM, Hastie AT, et al. Kinetics of IL-10 production after segmental antigen challenge of atopic asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:880-6.
- 121- Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, et al. In vitro generation of interleukin-10-producing

- regulatory CD4+ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper Type 1(Th1) and Th2 inducing cytokines. *J Exp Med* 2002;195:603-616.
- 122- Adib-Conquy M, Petit AF, Marie Ch, Fitting C, Cavillon JM. Paradoxical priming effects of IL-10 on cytokine production. *Int Immunol* 1999;11:689-698.
- 123- Shikano H, Kato Z, Kaneko H, et al. IFN- γ production in response to IL-18 or IL-12 stimulation by peripheral blood mononuclear cells of atopic patients. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1263-1270.
- 124- Cohn L, Homer RJ, Niu N, Bottomly K. T helper 1 cells and interferon γ regulate allergic airway inflammation and mucus production. *J Exp Med*;190:1309-1317.
- 125- Bhatia S, Mukhopadhyay S Jarman E, et al. Scavenger receptor-specific allergen delivery elicits IFN- γ -dominated immunity and directs established Th2-dominated responses to a nonallergic phenotype. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:321-8.
- 126- Plummeridge MJ, Armstrong L, Birchall MA, Millar AB. Reduced production of interleukin-12 by interferon- γ primed alveolar macrophages from atopic asthmatic subjects. *Thorax* 2000;55:842-847.
- 127- van Houwelingen AH, Kool M, de Jager SCA, et al. Mast cell-derived TNF- α primes sensory nerve ending in a pulmonary hypersensitivity reaction. *J Immunol* 2002;168:5297-5302.
- 128- Howarth PH, Durham SR, Kay AB, Holgat ST. The relationship between mast cell-mediator release and bronchial reactivity in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1987;80:703-11.
- 129- Trevino RJ, Veling MC. The importance of quantifying skin reactivity in treating allergic rhinitis with immunotherapy. *ENT J* 2000:362-366.

- 130- Platts-Mills TAE. The role of allergens in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:S361-364.
- 131- Mejia OJ, Salazar VR, Hernández GM, Guerrero NB. La importancia de la polinosis en el Valle de México. *Revista Alergia México* 1992;XXXIV:120-125.
- 132- Larry G, Arilan SS. Prevalence of dust mites in the homes of people living in eight different geographic areas of the United States. *J Allergy Clin Immunol* 1993;90:292-299.
- 133- Palomec OE, Hernández ChL, Sarrazola SDM y col. Aeroalergenos, pruebas cutáneas y enfermedad alérgica en 1091 pacientes. *Revista Alergia México* 1997;XLIV:63-66.
- 134- Spector SL, Bernstein IL, et al. Parameters for the diagnosis and management of sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102 Suppl 3:117-144.
- 135- Jones NS, Carney FR, Davis A. The prevalence of allergic rhinosinusitis: a review. *The Journal of Laryngology and Otology* 1998;112:1019-1030.
- 136- Spector Sh, Day J, et al. Pathophysiology and pharmacotherapy of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 102 Suppl 2:378-404.
- 137- Borish L, Aarons A, Rumblyrt J et al. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97:1288-96.
- 138- Koulis A, Robinson DS. The anti-inflammatory effects of interleukin-10 in allergic disease. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:747-50.
- 139- Hobbs K, Negri J, Klinnert M, et al. Interleukin-10 and transforming growth factor- β promoter polymorphisms in allergies and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1958-62.
- 140- Ackerman V, Marini M, Vittori E, et al. Detection of cytokines and their cell sources in

bronchial biopsy specimens from asthmatic patients. Relationship to atopic status, symptoms and levels of airway hyperresponsiveness. *Chest* 1994;105:687-696.

141- Borger P, Ten-Hacken H, Vellenga E, Kauffman H, Postma D. Peripheral blood T lymphocytes from asthmatic patients are primed for enhanced expression of IL-4 and IL-5 mRNA: associations with lung function and serum IgE. *Clin and Exp Allergy* 1999;29:772-779.

142- Humbert M, Corrigan Ch, Durham S, et al. Relationship between IL-4 and IL-5 mRNA expression and disease severity in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:704-708.

143- Robinson D, Hamid Q, Yong S et al. Predominant Th-2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992;326:298-304.

144- Walker C, Bauer W, Braun R et al. Activated T cells and cytokines in bronchoalveolar lavages from patients with various lung diseases associated with eosinophilia. *Am J Resp Crit Care Med* 1994;150:1038-48.

145- Van Der Pouw Krann KC, Boeije LC, De Groot ER, et al. Reduced production of IL-12 and IL-12-dependent IFN- γ release in patients with allergic asthma. *J Immunol* 1997;158:5560-5565.

Anexo 1
HOJA DE REGISTRO DE PACIENTES

Fecha: _____

Nombre: _____

Afiliación: _____

Delegación: _____

Ocupación: _____

Sexo: Femenino Masculino

Edad: _____

Clínica de Procedencia: _____

Religión: _____

Estado Civil: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Escolaridad: _____

Dx. de referencia: _____

Tx. recibidos:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Pruebas cutáneas positivas:

- 1- _____
- 2- _____
- 3- _____
- 4- _____
- 5- _____
- 6- _____

Anexo 2
HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Lugar y Fecha: _____

Por medio de la presente, yo _____
acepto participar en el proyecto de investigación titulado: “Evaluación del Perfil Inmunológico Humoral de Pacientes Asmáticos Alérgicos a Ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus* y *D. farinae*) y su Relación con los Diferentes Grados de Severidad Según GINA (Global Initiative for Asthma) y Pruebas de Función Respiratoria”

Registrado ante el comité local de Investigación con el número 066/2001.

El objetivo de este estudio es el investigar el efecto la inmunoterapia en pacientes con asma alérgica a ácaros.

Se me a explicado que mi participación consistirá en:

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos e inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio.

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

Entiendo que conservo el derecho a retirarme en el momento que yo decida sin que ello afecte la atención médica que recibo del Instituto.

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

Nombre y Firma del paciente

Nombre y Firma del Testigo

Nombre, Firma y Matrícula del Investigador Principal

ANEXO 3

REFERENCIA RÁPIDA DEL PROCEDIMIENTO - OptEIA Set: Human IL-4, IL-12p70 e IFN- γ e TNF- α

1. Dilución del anticuerpo de captura
 - Diluir el Ac. de Captura de la siguiente forma:
 - ✓ **IL-4** Diluir 48 μ l. del Ac. de Captura en 11.95 ml. del Coating Buffer (buffer de unión, carbonatos pH 9.5)/por placa.
 - ✓ **IL-12p70** Diluir 48 μ l. del Ac. de Captura en 11.95 ml. del Coating Buffer (buffer de unión, carbonatos pH 9.5)/por placa.
 - ✓ **IFN- γ** Diluir 48 μ l. del Ac. de Captura en 11.95 ml. del Coating Buffer (buffer de unión, carbonatos pH 9.5)/por placa.
 - ✓ **TNF- α** Diluir 24 μ l. del Ac. de Captura en 11.98 ml. del Coating Buffer (buffer de unión, carbonatos pH 9.5)/por placa
 - Agregar 100 μ l. del Ac. de Captura diluido a cada pozo.
 - Cubrir la placa e incubar a 4 °C toda la noche.
 - Aspirar y lavar 3 veces. (PBS/TWEEN 0.05%)
2. Bloqueo de la placa:
 - Agregar 200 μ l. de Assay Diluent (PBS pH 7.0 + 10%SFB inactivado por calor)a cada pozo.
 - Cubrir la placa e incubar por 1 hora a temperatura ambiente.
 - Aspirar y lavar 3 veces.
3. Dilución del Estándar o de la Muestra
 - Realizar diluciones seriadas de la siguiente forma:
 - ✓ Al 1er tubo agregar
 - ◇ IL-4: 20 μ l. + 3.98 ml. del Assay Diluent.
 - ◇ IL-12p70: 20 μ l. + 5.86 ml. Del Assay Diluent.
 - ◇ IFN- γ : 20 μ l. + 3.98 ml. del Assay Diluent.
 - ◇ TNF- α : 10 μ l. + 2.57 ml. del Assay Diluent.
 - ✓ Al 2do tubo: agregar 300 μ l. del primer tubo + 300 μ l. de Assay Diluent.
 - ✓ Al 3er tubo: agregar 300 μ l. del segundo tubo + 300 μ l. de Assay Diluent.
 - ✓ Al 4to tubo: agregar 300 μ l. del tercer tubo + 300 μ l. de Assay Diluent.
 - ✓ Al 5to tubo: agregar 300 μ l. del cuarto tubo + 300 μ l. de Assay Diluent.
 - ✓ Al 6to tubo: agregar 300 μ l. del quinto tubo + 300 μ l. de Assay Diluent.
 - ✓ Al 7mo tubo: agregar 300 μ l. del sexto tubo + 300 μ l. de Assay Diluent.
 - Agregar 100 μ l. de la muestra o el estándar (de cada tubo/dilución) a cada pozo.
 - Cubra la placa e incubar por 2 horas a temperatura ambiente.
 - Aspirar y lavar 5 veces.
4. Dilución del Ac. de Detección (Working Detector)
 - Diluir el Ac. de Detección:
 - ✓ IL-4: 48 μ l. del Ac. de Detección en 11.90 ml. de Assay Diluent

- ✓ IL-12p70: 48 μ l. del Ac. de Detección en 11.90 ml. de Assay Diluent
 - ✓ IFN- γ : 48 μ l. del Ac. de Detección en 11.90 ml. de Assay Diluent
 - ✓ TNF- α : 24 μ l. del Ac. de Detección en 11.93 ml. de Assay Diluent
 - A 11.95 ml. de la dilución del Ac. de Detección agregar 48 μ l del Reactivo Enzimático
 - Agregar 100 μ l. del Working Detector (Ac. de Detección + Av.HRP) a cada pozo.
 - Cubrir la placa e incubar por 1 hora a temperatura ambiente.
 - Aspirar y lavar 7 veces (cada lavado debe durar de 30 seg. a 1 min.)
5. Solución de Sustrato
- Disolver una tableta de TMB de 1 mg (SIGMA T5525) en 1 mL de DMSO (SIGMA D-5879), mantener a temperatura ambiente antes de utilizarla
 - Agregar 9 mL de Buffer Fosfato-Citrato pH 5.0 (25.7 mL de Na_2HPO_4 0.2M + 24.3 mL de Ac. Cítrico 0.1M + 50 mL de Agua desionizada, ajustar a pH 5.0 si es necesario) Mantener a temperatura ambiente antes de utilizarla
 - Inmediatamente previo al uso agregar 2 μ l de Peróxido de Hidrógeno (SIGMA H-1009)
 - Agregar 100 μ l. de la Sol. de Sustrato a cada pozo.
 - Incubar por 30 min. en la oscuridad a temperatura ambiente. **No cubrir.**
 - La reacción tomará una coloración azul.
6. Agregar 50 μ l. de la Sol. de Paro (H_2SO_4 2N) a cada pozo, con lo que la coloración será amarilla.
7. Leer a 450 nm. en Lector de ELISA en los siguientes 30 min.
Sustraer a 570 nm.

ANEXO 4

DETERMINACIÓN DE IL-13 CON EL PROTOCOLO DE LA U.I.M EN INMUNOQUÍMICA

ANTICUERPO DE CAPTURA

- Diluir el Ac. de captura (anticitocina-purificada a 1-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en solución de unión
 - SOLUCIÓN DE UNIÓN (*preparar lo que se va a utilizar en una semana, alicuotar por placa y dejar a 4 °C*)
 - ✓ Diluir 14.2g de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) en 800 mL de agua bidestilada
 - ✓ Ajustar a pH 9.0 con NaH_2HPO_4 (fosfato de sodio monobásico) 0.1 M (Pesar 1.2 g NaH_2HPO_4 de y aforar a 100 mL de agua bidestilada)
 - ✓ Aforar a un litro
 - DILUCION DEL Ac. DE CAPTURA:

	INICIAL (KIT)	DILUCIÓN A UTILIZAR	CANTIDAD DEL Ac. POR 1 mL DE SOL. DE UNIÓN
IL-13	0.5 mg/mL ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Tomar 4 μL . de la inicial + 996 μL S.U.
- Agregar 50 μL del Ab diluido a los pozos de una placa de ELISA
- Cubrir la placa con Kleen pack (evitar evaporación).
- Incubar a 37°C por una hora
- Incubar toda la noche a 4°C.
- Lavar 4 veces con Agua Tween 0.05%, (eliminar la solución del Ab de Captura)

BLOQUEO

- Bloquear la unión no específica agregando:
 - Por cada 100 mL de PBS (anexo 1)
 - 1g de leche semidescremada
 - 100 μL Tween 20
- Agregar 200 μL a cada pozo de la placa
- Cubrir la placa
- Incubar a 37°C por 2 horas
- Lavar 4 veces con Agua/Tween 0.05%

ESTÁNDARES Y MUESTRAS

Concentración del estándar	IL-13	Diluyente 1
300 pg/ml	100 μl del estándar de 3000 pg/ml	900 μl
75 pg/ml	100 μl del estándar de 300 pg/ml	300 μl
18.7 pg/ml	100 μl del estándar de 75 pg/ml	300 μl
4.7 pg/ml	100 μl del estándar de 18.7 pg/ml	300 μl
0 pg/ml		300 μl

- Colocar 100 μl por pozo de los estándares y de las muestras.

2. En los pozos donde debe ir la concentración de 0 pg/ml no se le agrega nada
3. Cubrir la placa
4. Incubar a 37 °C por 1 hora
5. Y dejar toda la noche a 4°C
6. Lavar 4 veces con Agua/Tween 0.05% (por cada 1L de Agua agregar 500 µL de Tween)

ANTICUERPO DE DETECCIÓN

1. Preparar REGULADOR DE BLOQUEO /TWEEN (PBS-BSA 1%-TWEEN)
 - ✓ 1 mL de PBS
 - ✓ 10 µL de albúmina
 - ✓ 1 µL Tween 20
2. Diluir el Ab de detección (anticitocina biotinilada 0.5-2µg/mL) en la Solución Reguladora de Bloqueo/Tween
 - ✓ 4 µL (2.0 µg/mL) del anticuerpo de detección por cada mL del Regulador de Bloqueo/Tween
3. Agregar 100 µL del Ab diluido en cada pozo
4. Cubrir la placa
5. Incubar la placa por 1 hora a temperatura ambiente
6. Lavar 6 veces con Agua/Tween 0.05%

ESTREPTAVIDINA-FOSFATASA ALCALINA (SA-AP)

(Cat. 19542-018 Gibco BRL)

1. Diluir la SA-AP 1:2000 en PBS-BSA 1%-TWEEN
 - ✓ Por cada 1mL de REGULADOR DE BLOQUEO TWEEN + 0.5 µL de Estreptavidina-Fosfatasa alcalina
2. Colocar 100 µL por pozo de la dilución anterior
3. Incubar 30' a temperatura ambiente
4. Lavar 6 veces con Agua/Tween

SUSTRATO

1. Para volumen final de 20 mL (*preparar lo que se va a utilizar en una semana y mantenerla a 4 °C*):
 - ✓ 2.0 g de Dietanolamina
 - ✓ 100µL de MgCl₂
 - ✓ 14mL de Agua destilada
 - ✓ Ajustar a pH 9.8 con HCl 1M y aforar a volumen final de 20 mL
 - ✓ Mantener a 4°C . PREPARAR AL MOMENTO

SOLUCIÓN REVELADORA p-NITROFENIL FOSFATO (p NPP)

1. Pesar 80 mg de pNPP y disolver en los 20 mL del sustrato (4mg/mL). PROTEGIDO DE LA LUZ
2. Agregar 100 µl por pozo
3. Incubar a temperatura ambiente por 30' (EN OSCURIDAD)
4. Leer a 405 nm en lector de ELISA.

ANEXO 5

DETERMINACIÓN DE IL-10 CON EL PROTOCOLO DE LA U.I.M EN INMUNOQUÍMICA

ANTICUERPO DE CAPTURA

- Diluir el Ac. de captura (anticitocina-purificada a 1-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en solución de unión
 - SOLUCIÓN DE UNIÓN (*preparar lo que se va a utilizar en una semana, alicuotar por placa y dejar a 4 °C*)
 - ✓ Diluir 14.2g de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) en 800 mL de agua bidestilada
 - ✓ Ajustar a pH 9.0 con NaH_2HPO_4 (fosfato de sodio monobásico) 0.1 M (Pesar 1.2 g NaH_2HPO_4 de y aforar a 100 mL de agua bidestilada)
 - ✓ Aforar a un litro
 - DILUCION DEL Ac. DE CAPTURA:

INICIAL (KIT)	DILUCIÓN A UTILIZAR	CANTIDAD DEL Ac. POR 1 mL DE SOL. DE UNIÓN
IL-10 S.U.	0.5 mg/mL ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
		Tomar 4 μL . de la inicial + 996 μL
- Agregar 50 μL del Ab diluido a los pozos de una placa de ELISA
- Cubrir la placa con Kleen pack (evitar evaporación).
- Incubar a 37 °C por una hora
- Incubar toda la noche a 4°C.
- Lavar 4 veces con Agua Tween 0.05%, (eliminar la solución del Ab de Captura)

BLOQUEO

- Bloquear la unión no específica agregando:
 - Por cada 100 mL de PBS (anexo 1)
 - 1g de leche semidescremada
 - 100 μL Tween 20
- Agregar 200 μL a cada pozo de la placa
- Cubrir la placa
- Incubar a 37°C por 2 horas
- Lavar 4 veces con Agua/Tween 0.05%

ESTÁNDARES Y MUESTRAS

- Realizar diluciones seriadas de la siguiente forma:
 - ✓ Al 1er tubo agregar: agregar 12 μL . + 988 μL . de REGULADOR DE BLOQUEO (2000 pg/ml).
 - ✓ Al 2do tubo: agregar 500 μL . del primer tubo + 500 μL . de REGULADOR DE BLOQUEO (1000 pg/ml).
 - ✓ Al 3er tubo: agregar 500 μL . del segundo tubo + 500 μL . de REGULADOR DE BLOQUEO (500 pg/ml).

- ✓ Al 4to tubo: agregar 500 μ l. del tercer tubo + 500 μ l. de REGULADOR DE BLOQUEO (250 pg/ml).
 - ✓ Al 5to tubo: agregar 500 μ l. del cuarto tubo + 500 μ l. de REGULADOR DE BLOQUEO (125 pg/ml).
 - ✓ Al 6to tubo: agregar 500 μ l. del quinto tubo + 500 μ l. de REGULADOR DE BLOQUEO (62.5 pg/ml).
 - ✓ Al 7mo tubo: agregar 500 μ l. del sexto tubo + 500 μ l. de REGULADOR DE BLOQUEO (31.25 pg/ml).
 - ✓ Al 8vo tubo: agregar 500 μ l. del séptimo tubo + 500 μ l. de REGULADOR DE BLOQUEO (15.62 pg/ml).
2. Colocar 100 μ l por pozo de los estándares y de las muestras.
 3. En los pozos donde debe ir la concentración de 0 pg/ml no se le agrega nada
 4. Cubrir la placa
 5. Incubar a 37 °C por 1 hora
 6. Y dejar toda la noche a 4°C
 7. Lavar 4 veces con Agua/Tween 0.05% (por cada 1L de Agua agregar 500 μ L de Tween)

ANTICUERPO DE DETECCIÓN

1. Preparar REGULADOR DE BLOQUEO /TWEEN (PBS-BSA 1%-TWEEN)
 - ✓ 1 mL de PBS
 - ✓ 10 μ L de albúmina
 - ✓ 1 μ L Tween 20
2. Diluir el Ab de detección (anticitocina biotinilada 0.5-2 μ g/mL) en la Solución Reguladora de Bloqueo/Tween
 - ✓ 2 μ L (2.0 μ g/mL) del anticuerpo de detección por cada mL del Regulador de Bloqueo/Tween
3. Agregar 100 μ L del Ab diluido en cada pozo
4. Cubrir la placa
5. Incubar la placa por 1 hora a temperatura ambiente
6. Lavar 6 veces con Agua/Tween 0.05%

ESTREPTAVIDINA-FOSFATASA ALCALINA (SA-AP)

(Cat. 19542-018 Gibco BRL)

1. Diluir la SA-AP 1:200 en PBS-BSA 1%-TWEEN
 - ✓ Por cada 1mL de REGULADOR DE BLOQUEO TWEEN + 0.5 μ L de Estreptavidina-Fosfatasa alcalina
2. Colocar 100 μ L por pozo de la dilución anterior
3. Incubar 30' a temperatura ambiente
4. Lavar 6 veces con Agua/Tween

SUSTRATO

1. Para volumen final de 20 mL (*preparar lo que se va a utilizar en una semana y mantenerla a 4 °C*):
 - ✓ 2.0 g de Dietanolamina

- ✓ 100 μ L de MgCl₂
- ✓ 14mL de Agua destilada
- ✓ Ajustar a pH 9.8 con HCl 1M y aforar a volumen final de 20 mL
- ✓ Mantener a 4°C . PREPARAR AL MOMENTO

SOLUCIÓN REVELADORA p-NITROFENIL FOSFATO (p NPP)

1. Pesar 80 mg de pNPP y disolver en los 20 mL del sustrato (4mg/mL). PROTEGIDO DE LA LUZ
2. Agregar 100 μ l por pozo
3. Incubar a temperatura ambiente por 30' (EN OSCURIDAD)
4. Leer a 405 nm en lector de ELISA.

SOLUCIÓN PBS

1. Pesar
 - ✓ NaCl 8.0 g
 - ✓ Na₂HPO₄ 1.16g
 - ✓ KH₂PO₄ 0.20g
 - ✓ KCl 0.20g
2. Disolver en 800 mL de agua destilada
3. Ajustar pH 7.0
4. Aforar a un litro