



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

DETERMINACION DE TNF  $\alpha$  EN LAVADOS NASALES DE  
PACIENTES CON EREA, ASMATICOS Y/O RINITICOS  
TOLERANTES Y SANOS

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE  
ALERGIA E INMUNOLOGIA CLINICA

PRESENTA:

DRA. GISELLA LISSETE BEARZOTTI GONZALEZ

MÉXICO, D. F.

AGOSTO DEL 2007,



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.



**DR. LUIS MANUEL TERÁN JUÁREZ**  
**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE**  
**INVESTIGACIÓN EN INMUNOGENÉTICA Y ALERGIA**  
**PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ALERGIA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA**  
**ASESOR DE TESIS**  
**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**



**DRA. MA. DE LA LUZ H. GARCÍA CRUZ**  
**MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE**  
**INVESTIGACIÓN EN INMUNOGENÉTICA Y ALERGIA**  
**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**

**INER**

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES**  
**RESPIRATORIAS**  
**DIRECCION DE ENSEÑANZA**



## **AGRADECIMIENTOS**

**A DIOS** que esta por encima de todo, por todas sus bendiciones, y porque siempre esta presente en cada momento de mi vida.

**A MI PAPÁ: GUSTAVO** por su amor, fuerza y sabiduría que me dedicó desde el inicio de mis estudios, por ser un ejemplo a seguir, como profesional y como ser humano, por su confianza en que alcanzaría esta meta cuando en momentos lo creía imposible.

**A MI MAMÁ: AMÉRICA** por su amor y fortaleza que me dio desde que nací, porque recibí la educación enseñanza para empeñarme siempre en ser una mejor persona, por los desvelos compartidos donde aprendimos cosas que ahora son invaluable. Y a los dos, por haberme dado la vida, y su apoyo incondicional.

**A MIS HERMANAS DANIELA Y CLAUDIA** por todo su apoyo, su compañía y las vivencias a su lado que me enseñaron a crecer, compartir y disfrutar la vida.

**A MI ABUELO LUCIANO** por su cariño, entusiasmo y entereza que me demostró siempre para que luchara por conseguir lo que me había propuesto y seguir adelante cosechando logros.

**A MIS ABUELOS** que aunque ya no están conmigo, me contagiaron su amor por la vida, me enseñaron que no importa lo fácil o difícil de las cosas, sino la importancia de obtenerlas, porque pude ayudarlos en lo profesional a lo largo de mis estudios.

**AL DR. LUIS MANUEL TERÁN** por haberme guiado en ésta nueva área de oportunidad que es la investigación, por toda su ayuda, además por estar ahí siempre que lo necesité.

**AL DR. GUSTAVO VILLARREAL DE LA FUENTE** por haber despertado en mí la inquietud por el mundo de la inmunología y alergia, además de haber sido mi mentor en lo personal y en lo profesional, por toda su ayuda para hacer que mi sueño se hiciera realidad.

**AL DR. HECTOR VALDÉZ LÓPEZ** por prestarme su hombro en el cuál apoyarme a llorar en los momentos de desesperación y angustia, también por toda su paciencia.

**Y A TODAS LAS PERSONAS** que de alguna u otra manera, me alentaron, me apoyaron y ayudaron a obtener mis logros.

## ÍNDICE

I	RESUMEN.....	1
II	TÍTULO.....	3
III	ANTECEDENTES.....	3
IV	HIPÓTESIS.....	14
V	JUSTIFICACIÓN.....	15
VI	OBJETIVOS.....	16
VII	MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
VIII	VARIABLES DEL ESTUDIO.....	22
IX	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	23
X	CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	24
XI	RESULTADOS.....	25
XII	DISCUSIÓN.....	34
XIII	CONCLUSIONES.....	35
XIV	AGRADECIMIENTOS.....	36
XV	BIBLIOGRAFÍA.....	37
XVI	ANÉXOS.....	42

## **I RESUMEN:**

**Título:** Determinación de TNF $\alpha$  en lavados nasales de pacientes con Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina (EREA), Rinitis y/o Asma tolerantes y sanos.

**Introducción:** La EREA ( Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina) es un síndrome caracterizado por poliposis nasal, asma y sensibilidad a la aspirina y afecta entre 3% y 11% de la población asmática adulta, se ha propuesto que la LTC<sub>4</sub>S es la vía metabólica distintiva en la EREA, sin embargo, el mecanismo exacto aún es oscuro. Este proceso inflamatorio es regulado por leucotrienos, las quimiocinas y el TNF $\alpha$  el cuál es un importante mediador inflamatorio que en este estudio se investigará su potencial participación en EREA a nivel local. Consecuentemente poder hacer estudios para encontrar una nueva terapia para este padecimiento y hacer estudios de causalidad.

**Hipótesis:** Los niveles de TNF $\alpha$  se encuentran más elevado en forma basal y post-reto nasal con L-ASA en pacientes con EREA en comparación con asmáticos, riniticos y sanos. Por lo que esta citocina puede ser la responsable de la cronicidad de la rinosinusitis y la poliposis nasal en la EREA.

**Justificación:** La EREA es un síndrome respiratorio que frecuentemente pone en peligro la vida de los pacientes y hasta el momento se desconoce el mecanismo preciso que causa esta enfermedad. El TNF $\alpha$  que es una citocina proinflamatoria promueve la infiltración crónica de células inflamatorias activándolas y promoviendo la liberación continua de mediadores. Al asociar las concentraciones aumentadas del TNF $\alpha$  en las secreciones nasales de pacientes con EREA se podría dar paso a la elaboración de inhibidores de TNF $\alpha$  a nivel local evitando así los efectos secundarios del mismo, a una baja de las exacerbaciones y una menor recurrencia de los pólipos posterior a la cirugía, y al paso de estudios que demuestren causalidad.

**Objetivo:** Determinar la concentración de TNF $\alpha$  en lavados nasales de pacientes con EREA.

**Material y Método:** Se realizó una investigación Clínica-básica en la cuál se estudiaron 19 pacientes con EREA, 12 riniticos y/o asmáticos tolerantes, y 7 controles sanos. ( No fumadores )

Confirmado el diagnóstico con Reto nasal con L-aspirina positivo, poliposis nasal por nasoendoscopia, y a los pacientes con asma por pruebas de función pulmonar. Y se realizaron pruebas cutáneas para ver atópicos y no atópicos y se tomaron muestras de lavados nasales pre y post reto nasal con L-ASA para medir la concentración de TNF $\alpha$  y posteriormente fué procesado por el método de ELISA.

**Resultados:** Se encontró que en los pacientes con EREA se encuentra más elevado el nivel del TNF $\alpha$  basal y post-reto nasal con L-ASA.

**Conclusión:** Se encontró que en los pacientes con EREA se encuentra más elevado el nivel del TNF $\alpha$ , sin embargo, se requieren más estudios para determinar el papel del TNF $\alpha$  en la cronicidad de la enfermedad.

## **ANTECEDENTES**

**ENFERMEDAD RESPIRATORIA EXACERBADA POR ASPIRINA (EREA)** Antiguamente llamada Síndrome de Samter, que es un síndrome caracterizado por rinosinusitis polipoidea crónica, asma bronquial e hipersensibilidad a la aspirina. (1). Por primera vez a principios del siglo XX Hirschberg describió una reacción de bronco espasmo tras la ingesta de aspirina (2). Widal y Cols, veinte años después asociaron este medicamento con la presencia de asma y poliposis nasal (3). Posteriormente Samter y Beers, en 1968, publicaron sus observaciones de 10 años en donde de 1000 casos de asma, 182 presentaron la tríada característica que durante mucho tiempo llevó el nombre del primer autor (4), sin embargo actualmente es más aceptado el término Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina (EREA).

Este síndrome afecta entre el 3% y el 11% de la población asmática adulta basando el diagnóstico solo en la historia clínica, y este número se duplica cuando los pacientes se someten a reto específico.

Recientemente Jenkins y colaboradores realizaron una revisión sistemática de la cuál se obtuvo una prevalencia en adultos del 21% y en niños del 5%, posterior a reto oral específico (5). La aparición de los síntomas de este síndrome es insidiosa; inicia durante la tercera o cuarta década de la vida típicamente después de un cuadro de infección respiratoria viral que se continúa con síntomas de rinosinusitis persistente y de difícil control (congestión nasal, rinorrea, anosmia) y posteriormente poliposis nasal, asma bronquial y sensibilidad a AAS.(6)

La presentación aguda de este síndrome en la mayoría de los pacientes, consiste en una crisis asmática que inicia dentro de las tres primeras horas tras haber ingerido aspirina u otros AINES con reacción cruzada; regularmente se acompaña de rinorrea profusa, hiperemia conjuntival y ocasionalmente edema periorbitario, dolor abdominal y urticaria.

Normalmente el 60% del ácido araquidónico es metabolizado por la ciclooxigenasa y el 40% por la lipooxigenasa, en pacientes con EREA el 90 % es metabolizado por la lipooxigenasa.

La principal propuesta involucra anormalidades en el metabolismo del ácido araquidónico primordialmente la inhibición de COX-1 y por ende la desviación de sustrato hacia la vía de la lipooxigenasa (LO); este cambio metabólico se refleja en sobreproducción y liberación de leucotrienos (LT) C4, D4 y E4 que han mostrado ser los mediadores inflamatorios con mayor potencial bronco constrictor.

Además, producen hipersecreción de moco y edema de la vía aérea, así como un mayor estímulo para la liberación de citocinas a partir de células mast y eosinófilos. (7).

En la mayoría de las condiciones inflamatorias de los senos paranasales hay una alteración reversible del epitelio de la membrana respiratoria que puede ser resuelta con medicamentos, inmunoterapia o cirugía; sin embargo en los pacientes con EREA, existe un proceso inflamatorio mucho mas importante, con una migración exagerada de eosinófilos, lo que provoca un desorden profuso de la membrana naso sinusal lo que dificulta el control de la enfermedad con medidas conservadoras (8).

Relacionado a la genética se ha concluido que la LTC<sub>4</sub>S es la vía metabólica distintiva en la EREA, existiendo sobre expresión de ella en la mucosa bronquial de estos pacientes hasta 5 veces más que en los pacientes asmáticos tolerantes y 18 veces más que en sujetos sanos. (9). A este respecto, Sanak y colaboradores (10) relacionaron la sobre expresión del alelo -444C de la enzima LTC<sub>4</sub>S con la presencia de sensibilidad a la aspirina en personas asmáticas comparados con asmáticos tolerantes y sujetos sanos; estos autores observaron un incremento del mRNA para esta enzima en eosinófilos de sangre periférica y mayor excreción urinaria de LTE<sub>4</sub> posterior a reto específico en aquellos sujetos portadores del alelo -444C.

Rinosinusitis y poliposis nasal: De los métodos disponibles para estudiar patología nasal, la obtención de secreciones mediante el lavado mecánico se ha popularizado, ya sea en situación basal o posterior a reto con AAS.

Ya en el año 1988 Ferreri y su grupo (11) analizaron lavados nasales obtenidos antes y después de ingerir aspirina en sujetos sanos, asmáticos tolerantes a aspirina, asmáticos intolerantes y otro grupo de intolerantes desensibilizados; encontraron niveles más elevados de LTC<sub>4</sub> y de histamina en pacientes intolerantes a aspirina con reacción bronco espástica y nasocular que se asociaron al descenso del FEV<sub>1</sub>, no hubo disminución de PGE<sub>2</sub> ni aumento de LTB<sub>4</sub> y no se elevaron los metabolitos en el resto de los grupos.

Cuatro años después, Picado (12) obtuvo lavados nasales de sujetos sanos, pacientes tolerantes e intolerantes a la aspirina, a los cuales después de instilarles aspirina en la nariz se les hicieron mediciones de leucotrienos, 15-HETE y prostaglandinas. Observó incremento de leucotrienos 60 minutos después del reto solo en los pacientes intolerantes y también hubo correlación con los síntomas; las prostaglandinas se inhibieron tras el reto en los tres grupos.

En 1995 el trabajo de Hamilos y colaboradores (13) confirmó que la eosinofilia es un hallazgo en pólipos nasales de pacientes alérgicos y no alérgicos, sin embargo hubo diferencias en el patrón de citocinas expresadas. Específicamente se encontró que los pacientes alérgicos expresaron más IL-3, IL-4, IL-5 y GM-CSF; el perfil de los pacientes con eosinofilia no alérgica involucra la producción de GM-CSF, IL-3 e IFN- $\gamma$ , y es independiente de IL-4 e IL-5. Es de interés, que los pacientes no alérgicos tuvieron una fuerte correlación con historia de sensibilidad a la aspirina, además de ser el IFN- $\gamma$  la citosina más distintiva de ese subgrupo.

Como se mencionó previamente la intolerancia a la aspirina y a otros AINES frecuentemente es acompañada de poliposis nasal. En un estudio a gran escala de la comunidad europea (14), se reporta una frecuencia de pólipos nasales del 58.1% en 365 pacientes con EREA, pero pueden encontrarse frecuencias tan altas como 77% (15).

Además se ha observado que los pólipos tienden a recurrir hasta en un 40% de los pacientes sometidos a polipectomía propiciado que con el tiempo se requieran múltiples polipectomías (16).

Picado y colaboradores han estudiado el metabolismo del ácido araquidónico en pólipos nasales (17), y han encontrado que los pólipos producen menos PGE2 que la mucosa nasal y que por el contrario hay mayor cantidad de LTC4 y LTB4 en ellos, a la vez que observaron la desregulación de las ciclooxigenasas 1 y 2 previamente mencionada en pacientes con intolerancia a la aspirina.

Esto se mostró recientemente en forma detallada por Steinke y su grupo (18), quienes compararon la expresión de cisteinil leucotrienos (Cys-LT) y de sintetasa de LTC4 (LTC4S) en pacientes con sinusitis hiperplásica eosinofílica crónica, poliposis nasal no eosinofílica, y sujetos sanos; sus resultados fueron que el tejido eosinofílico expresa cantidades significativamente mayores de ambos marcadores.

### **1- TNF $\alpha$**

El TNF $\alpha$  es una citocina pro inflamatoria multifactorial secretada predominantemente por monocitos y macrófagos, pero también producida por eosinófilos la cual aumenta la expresión de moléculas de adhesión celular que contribuye al reclutamiento celular y a la inflamación persistente.

El TNF $\alpha$  es sintetizado como una proteína de membrana de 26kD (pro-TNF)

que es procesada por las enzimas procesadoras de la enzima convertidora de TNF(19) ( $\text{TNF}\alpha$ , converting enzyme “TACE”) miembro de la familia de las metaloproteasas desintegrinas, que es una glicoproteína anclada a la membrana., para liberar una molécula de TNF de 17 kD. La molécula soluble puede unirse a sus principales receptores TNFR1 (29) y TNFR2. (20, 21).

El gen del  $\text{NF}\alpha$  se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 6, (22) formando parte del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), el sistema mas polimórfico descrito en mamíferos, la principal fuente celular del  $\text{TNF}\alpha$  son los fagocitos mononucleares activados, uno de los estímulos mas potente para desencadenar la síntesis de  $\text{TNF}\alpha$  por los macrófagos es la LPS, por lo que en las infecciones por Gram negativos, se producen cantidades muy importantes de  $\text{TNF}\alpha$ .

Su principal función biológica consiste en estimular la atracción de neutrófilos y monocitos hacia las zonas de infección y activar a las células para erradicar los microorganismos.

El  $\text{TNF}\alpha$  media estos efectos a través de varias acciones sobre células endoteliales vasculares y los leucocitos, provoca que las células endoteliales vasculares expresen moléculas de adhesión que hacen la superficie endotelial adherente para los leucocitos; inicialmente para los neutrófilos y después para los monocitos y linfocitos; las moléculas de adhesión mas importantes son las selectinas y ligandos de integrinas de leucocitos.

Otras células conocidas por expresar  $\text{TNF}\alpha$  incluyen linfocitos B, células citotóxicas naturales (NK), mastocitos, células de Paneth, células de mesénquima intestinal, queratinocitos, células de la microglia, astrositos, células de músculo liso y ciertas líneas de células tumorales. El  $\text{TNF}\alpha$  induce su propia transcripción a través de la activación del factor nuclear  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), pero también induce elementos reguladores negativos específicos que proveen un control estricto en su propia producción.

De igual forma induce la producción de citosinas reguladoras, como la IL-10, la cual suprime la liberación del  $\text{TNF}\alpha$  en respuesta a la endotoxina.

El  $\text{TNF}\alpha$  es causante de una gran variedad de respuestas celulares y orgánicas incluyendo fiebre, choque, daño tisular, necrosis tumoral, anorexia, inducción de otras citosinas y moléculas inmunoreguladoras, proliferación y diferenciación celular, así como apoptosis. Es una potente citocina con una amplia variedad de actividades pro inflamatorias y auto inmunes, en donde pudiera participar de manera indirecta

Los mecanismos por los cuales las señales del  $\text{TNF}\alpha$  generan una gran variedad de respuestas son probablemente causados por la distribución de los receptores de la citosina en diferentes tipos celulares y sus respuestas diferenciales para la forma secretada y de membrana de la misma, en varios procesos inmunológicos dependiente de éste.

El TNF $\alpha$  es una citocina pro inflamatoria que da una forma rápida de defensa contra la infección pero es fatal en exceso. Winchester et al. (23) estudiaron la asociación del polimorfismo de -308 del TNF y la inserción/delección de la Enzima convertidora de Angiotensina con la historia de asma.

Vielhauer et al. (24) concluyeron que las propiedades anti-inflamatorias e inmunosupresoras del TNF $\alpha$  segregan a nivel de sus receptores, TNFR1 promueve una respuesta inmune, y TNFR2 que juega un papel importante en el daño a tejidos mediado por el complemento. Estudios in vivo e in vitro han demostrado que la generación de altos niveles de TNF $\alpha$  lleva a la exacerbación de las respuestas inflamatoria y pro-oxidativa que son importantes en la patogénesis de algunas enfermedades incluyendo varios desordenes pulmonares (25, 26). La desregulación del reclutamiento de leucocitos y linfocitos son los focos inflamatorios que llevan a la inflamación. El TNF $\alpha$  también depleta la glutatión celular (GSH), un antioxidante celular (27).

Estudios in vivo e in vitro muestran que el TNF $\alpha$  estimula la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS) en el tejido pulmonar y no pulmonar.

La estimulación de TNF $\alpha$  produce altos niveles de ROS en células endoteliales (28) y neutrófilos (29).

De los diferentes tipos celulares, los ROS derivados de los neutrófilos juegan un rol muy importante dependiente de TNF $\alpha$  en la alteración vasorreactiva pulmonar (30). En condiciones patofisiológicas, la generación de TNF $\alpha$  a niveles altos lleva al

desarrollo de respuestas inflamatorias que son la distinción de varias enfermedades pulmonares como asma bronquial, bronquitis crónica, EPOC, daño pulmonar agudo y SIRA. En la inhalación de  $TNF\alpha$  en ratas se ha visto que produce neutrofilia en el líquido alveolar y una hiperreactividad bronquial (32). En modelos experimentales con asma el bloqueo de la actividad del  $TNF\alpha$  ha demostrado reducir la extravasación de plasma y el reclutamiento de granulocitos en la vía aérea (31, 32, 33,34).

La inhalación de  $TNF\alpha$  produce una respuesta inflamatoria caracterizada por un número incrementado de neutrófilos y eosinófilos en el esputo y por una respuesta hiperreactora. (35,36). Estudios recientes han mostrado que el tratamiento con etanercept (antagonista del receptor de  $TNF\alpha$ ) esta asociado con la mejoría de los síntomas nasales, función pulmonar e hiperreactividad bronquial en el asma refractaria (37,38). Hay evidencia que indica que niveles altos de  $TNF\alpha$  se asocia directamente a complicaciones del asma.

En el bronquio las células epiteliales, endoteliales y las células del músculo liso son los principales blancos del  $TNF\alpha$  causando hiperplasia y vasoconstricción por liberación secundaria de endotelina-1.

Estudios recientes sugieren que el  $TNF\alpha$  puede estar envuelto en el desarrollo de la hiperreactividad bronquial alterando directamente las propiedades contráctiles del músculo liso de la vía aérea. Algunos investigadores han mostrado que el  $TNF\alpha$  estimula marcadamente la función sintética de las fibras de músculo liso (ASM) definido como la secreción de citocinas y quimiocinas y la expresión de moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) y de adhesión vascular (VCAM-1) (39).

Otros estudios sostienen la idea de que el TNF $\alpha$  juega un papel importante en la modulación de las respuestas del músculo liso de la vía aérea induciendo la señal temprana (menos de una hora) y la tardía (mas de 4 horas) que inducen la homeostasis del calcio, en adición también, se reporta que la activación de TNFR-1 por el TNF $\alpha$  regula la función del ICAM-1 en las células del músculo liso de la vía aérea (39).

En otros estudios se observó un aumento en la expresión del TNF $\alpha$  unidas a membrana del TNFAR-1 y de la enzima convertidora del TNF $\alpha$  en la sangre en los pacientes con asma severa refractaria. El TNF $\alpha$  junto con la IL-5 induce la expresión de las moléculas de adhesión (principalmente selectiva P y E), ELAM-1 e ICAM-1 y más retardada de (VCAM-1) necesarias para la introducción de células inflamatorias de la vía aérea (39).

También se le ha atribuido quimiotáctico directo para neutrófilos, y monocito in vitro, un efecto sobre los eosinófilos, aumentando su capacidad citotóxica y su maduración y contribuye además a la diferenciación de monocitos a macrófagos.

El TNF $\alpha$  puede actuar sobre el remodelamiento del tejido bronquial en el asma a través del crecimiento de fibroblastos, activando mecanismos profibróticos del subepitelio. Se ha demostrado que el TNF $\alpha$  en los pólipos aumenta la expresión de moléculas de adhesión celular en células endoteliales y promueven la adhesión leucocitaria a los vasos sanguíneos y la migración trasendotelial de granulocitos

incluyendo eosinófilos. El TNF $\alpha$  puede promover la supervivencia de los eosinófilos por medio de la expresión aumentada de factor de crecimiento de granulocitos.

Finalmente el TNF $\alpha$  puede causar el tipo de daño epitelial característico de los pólipos, directamente o por medio de la función citotóxica de los eosinófilos. Los pacientes con rinitis alérgica han mostrado tener expresión aumentada de mRNA de TNF $\alpha$  en el tejido así como la exposición de la proteína TNF $\alpha$  en mucosa nasal (39).

Se demostró en el estudio hecho con el reto nasal con TNF $\alpha$ , que existe una exudación plasmática asociada con otras citocinas como el IL-8 y una actividad granulocítica mayor (39) F. En el año 2005 Flores, García, Terán y Camarena (40) demostraron que los pacientes con EREA presentan un incremento en los polimorfismos que los promotores TNF del -308 y -238 en forma significativa. El genotipoheterocigoto G/A de los promotores -308 y -238 aumentan el riesgo de padecer

El genotipoheterocigoto G/A de los promotores -308 y -238 aumentan el riesgo de padecer esta enfermedad.

#### **IV HIPÓTESIS**

Los niveles de TNF $\alpha$  se encuentran más elevados en forma basal y post-reto nasal con L-ASA en pacientes con EREA en comparación con asmáticos, riniticos y sanos.

Por lo que esta citocina puede ser la responsable de la cronicidad de la rinusinusitis y la poliposis nasal en la EREA.

## V JUSTIFICACIÓN

Los pacientes con enfermedad respiratoria exacerbada por ácido acetilsalicílico cursan con rinosinusitis y poliposis nasal de difícil manejo, ya que característicamente los síntomas son severos y persisten a pesar del uso continuo de medicamentos tanto tópicos como sistémicos.

El TNF $\alpha$  es una citocina pro inflamatoria que no solo activa y promueve la infiltración crónica de diversas células inflamatorias sino que estimula la liberación de mediadores de la inflamación.

La demostración de que TNF $\alpha$  se libera localmente en la reacción inducida por la aplicación nasal de aspirina podría llevar a introducir el uso de antagonistas de esta citocina como una nueva modalidad terapéutica de la enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina.

## **VI OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar si el  $\text{TNF}\alpha$  se libera localmente en las vías aéreas superiores de pacientes con enfermedad respiratoria exacerbada por ácido acetilsalicílico.

### **Objetivos Específicos**

- 1- Investigar si el  $\text{TNF}\alpha$ , en condiciones basales, se encuentra en concentraciones elevadas en el lavado nasal de pacientes con EREA.
- 2- Determinar si el reto nasal específico con L-ASA afecta la liberación de  $\text{TNF}\alpha$ .
- 3- Valorar si los niveles de  $\text{TNF}\alpha$  correlacionan con los síntomas nasales en los pacientes con EREA.
- 4- Determinar los niveles de  $\text{TNF}\alpha$  en los pacientes con rinitis y/o asma tolerantes y sanos.

## **VII- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1- TIPO DE INVESTIGACIÓN**

Estudio experimental, longitudinal, prospectivo y analítico.

### **2- POBLACIÓN EN ESTUDIO**

Se incluyeron 3 grupos: **GRUPO 1:** 19 pacientes con enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina, **GRUPO 2:** 12 pacientes con rinitis y/o asmáticos tolerantes a aspirina y **GRUPO 3:** 7 pacientes controles sanos.

A todos los pacientes se les realizó historia clínica y se les abrió expediente clínico en este Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias con historia clínica completa. en un periodo de tiempo comprendido de Enero 2007 a Junio del mismo año.

Todos los participantes de este programa suspendieron medicación previa al estudio: los broncodilatadores de acción corta e intermedia se suspendieron 24 horas antes del estudio, los esteroides inhalados y antihistamínicos se suspendieron 48 horas previas al estudio. El uso de antileucotrienos se suspendieron 96 horas antes de participar del estudio. Se recomendó no ingerir cafeína 4 horas previo al estudio y evitar cualquier tipo de ejercicio durante los días de estudio. A todos los pacientes se les pidió firmar la carta de consentimiento informado.

Para valorar el estado atópico y respiratorio de los pacientes se realizaron pruebas cutáneas, reto nasal con lisil aspirina y pruebas de función pulmonar.

### **3- CRITERIOS DE INCLUSIÓN:**

- Pacientes de población mexicana con diagnóstico de enfermedad respiratoria alérgica (rinitis y/o asma), enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina y voluntarios sanos.
- Pacientes de entre 18 y 60 años que puedan realizar las pruebas del estudio como espirometría, rinomanometría y reto nasal con L-ASA.
- Pacientes que estén de acuerdo en entrar al protocolo y firmen la carta de consentimiento informado.

### **4- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

- Pacientes cuyo FEV1 este por abajo de 80%.
- Pacientes con enfermedades infecciosas o auto-inmunes concomitantes.
- Pacientes con EREA y con ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA.
- Pacientes que estén tomando medicamentos que interfieran con las pruebas o medicaciones como antihistamínicos, esteroides sistémicos, inhalados o tópicos y antileucotrienos.
- Embarazo o lactancia.

### **5- MEDICIONES CLÍNICAS Y FISIOLÓGICAS**

## **RETO CON LISIL ASPIRINA**

Previo a reto con lisil aspirina, se les realizaron a todos los pacientes mediciones de la función respiratoria y del flujo y resistencias nasales con un espirómetro-rinomanómetro Jaeger modelo Flowscreen Pro que se calibra diariamente. La realización del estudio se hizo colocando papel filtro (1xcm.) con 12.5 mg de lisil-aspirina en cada narina (dosis total 25 mg). Este modelo de reto lo hemos utilizado en protocolos anteriores (C-47-99).

15 - 30 minutos posteriores al reto local, se realizó medición del FEV1 y las cuales se repitieron cada hora durante las cuatro horas subsecuentes ( 1, 2, 3, y 4 ).

El reto se consideró positivo y se observó un descenso persistente del flujo inspiratorio nasal de un 40% más del valor basal o una caída del FEV1 un 20% del valor basal. Una vez concluido el estudio, estos cambios respiratorios se revertieron con el uso de nebulizaciones con esteroide y broncodilatador si fué requerido con la administración de esteroides sistémicos. En todo momento los participantes estuvieron bajo estrecha vigilancia médica, valorando la presencia de reacciones naso-oculares, bronco espásticas o urticariales, cambios en la tensión arterial, frecuencias cardiaca y respiratoria o variaciones en la saturación de oxígeno.

Antes de iniciar el reto y posterior a la dosis fija cada paciente se evaluó para determinar la severidad de los síntomas y signos respiratorios mediante una escala clínica

(escala de Rojas, previamente validada), además cada paciente tuvo visitas de seguimiento a los 7 y 14 y 21 días posteriores al reto.

## **PRUEBAS CUTÁNEAS POR PRICK**

Para la realización de una prueba cutánea por prick se utilizaron alérgenos Alk Abello estandarizados, la prueba consistió en depositar en la piel del paciente una gota del alérgeno y luego realizar una puntura a través de la gota con el accuset de Alk Abello (lanceta especial de 1mm de longitud), con la finalidad de introducir en la epidermis y en la dermis una cantidad mínima de alérgeno, posterior a esto se leyó la reacción en 15 minutos para valorar la tríada de Lewis: pápula, eritema y prurito.

El resultado se expresó en milímetros. Las pruebas cutáneas se realizaron en el consultorio de alergia en el cuál cuenta con carro rojo, para cualquier reacción indeseable. El riesgo de reacciones sistémicas con la prueba cutánea de prick es de 0.04% de pulso.

## **6- OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

### **LAVADO NASAL**

A todos los pacientes se les realizó lavado nasal en condiciones basales (antes del reto) y posterior al reto con lisil aspirina utilizando 10ml de solución fisiológica ( 5 ml en cada narina ) instilados con un dispositivo diseñado para este fin. Las muestras

obtenidas ( lavados nasales ) se procesaron inmediatamente y cuando esto no fue posible, se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su procesamiento.

## **ELISA**

La medición de TNF $\alpha$  y de leucotrienos se realizó en el sobrenadante de los lavados nasales por la técnica de ELISA el cuál consiste de un anticuerpo en fase sólida y al cuál se agrega un segundo anticuerpo con cromógena que revela la concentración de esta citosina. La escala de medición de TNF $\alpha$  fué en pg/ml.

## **ESCALA DE ROJAS**

La escala clínica de Rojas que se aplicó evalúa los síntomas clásicos de rinitis ( rinorrea, estornudos, prurito, obstrucción nasal ), además de signos como coloración conjuntival, coloración facial, tamaño y color de ambos cornetes inferiores; el puntaje mínimo posible es 0 y el máximo posible es 30. (41) Ver anexo (1).

## **IX- DISEÑO EXPERIMENTAL**

PRIMER VISITA Explicación del protocolo de investigación, firma de la carta de consentimiento informado, realización de historia clínica, espirometría y rinomanometría en forma basal y control de síntomas en caso de presentarlos.

SEGUNDA VISITA Revisión del paciente y realización de pruebas cutáneas.

TERCER VISITA Realización de espirometría pre y post broncodilatador y rinomanometría.

CUARTA VISITA Realización de Reto nasal con L-ASA con dosis fija, obtención de muestras, y escala clínica de Rojas y procesamiento de muestras.

QUINTA- SEXTA Y SÉPTIMA VISITA Revisión subsecuente de todos los pacientes sometidos al reto.

## XI- RESULTADOS

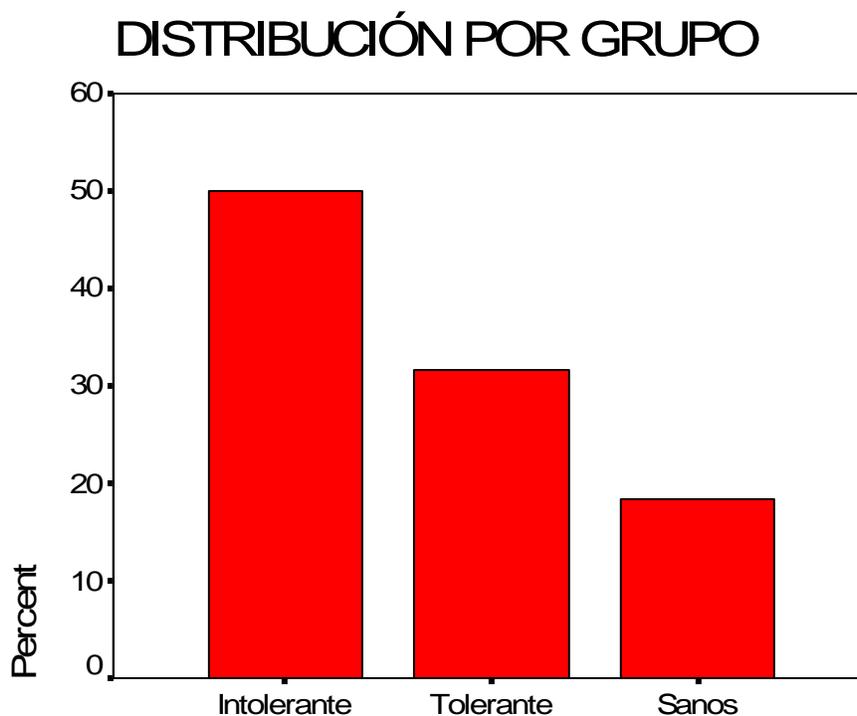
### ANALISIS DESCRIPTIVO

SUJETO	EDAD	SEXO	ATOPIA	RETO L- ASA	FLUJO PRE RETO	FLUJO POST RETO	ROJAS PRE RETO	ROJAS POST RETO	FEV1% BASAL
1	33	F	SI	+	362	324	3	4	119
2	36	F	NO	+	750	350	3	13	120
3	37	F	NO	+	772	360	4	18	90.7
4	40	F	NO	+	376	116	4	9	105
5	35	M	SI	+	716	362	4	8	93.5
6	47	F	NO	+	514	248	3	7	111
7	40	F	NO	+	288	72	4	9	109
8	42	F	SI	+	0	0	6	8	93.4
9	72	F	NO	+	820	288	4	6	112
10	58	F	SI	+	278	NO	4	12	101
11	35	M	SI	+	254	68	6	11	122
12	62	F	SI	+	1102	424	5	7	94
13	36	F	SI	+	510	32	3	11	93.3
14	50	F	NO	+	662	36	3	13	112
15	27	F	SI	+	360	164	4	12	98
16	25	F	SI	+	628	228	4	12	96
17	43	F	SI	+	418	192	2	8	121
18	33	F	SI	+	410	144	3	8	82.9
19	38	F	SI	+	176	32	3	6	126
20	36	F	NO	-	444	398	4	7	126
21	29	F	SI	-	284	324	3	4	118
22	27	F	SI	-	800	752	3	4	102
23	37	F	SI	-	566	638	4	6	108
24	31	M	SI	-	252	352	3	4	82.6
25	30	F	SI	-	392	350	5	8	90
26	29	F	SI	-	392	280	4	6	114
27	44	F	SI	-	754	416	2	5	120
28	36	M	SI	-	376	432	2	3	122
29	21	F	SI	-	248	600	4	4	104
30	39	F	SI	-	400	416	0	5	105
31	18	F	NO	-	252	518	0	0	116
32	29	M	NO	-	250	270	0	0	100
33	50	M	NO	-	325	410	0	0	102
34	29	M	SI	-	411	400	0	0	104
35	30	M	NO	-	204	213	0	0	110
36	46	M	SI	-	378	272	0	0	112
37	32	M	NO	-	168	173	0	0	94
38	44	F	SI	-	410	410	0	0	97.2

Tabla 1

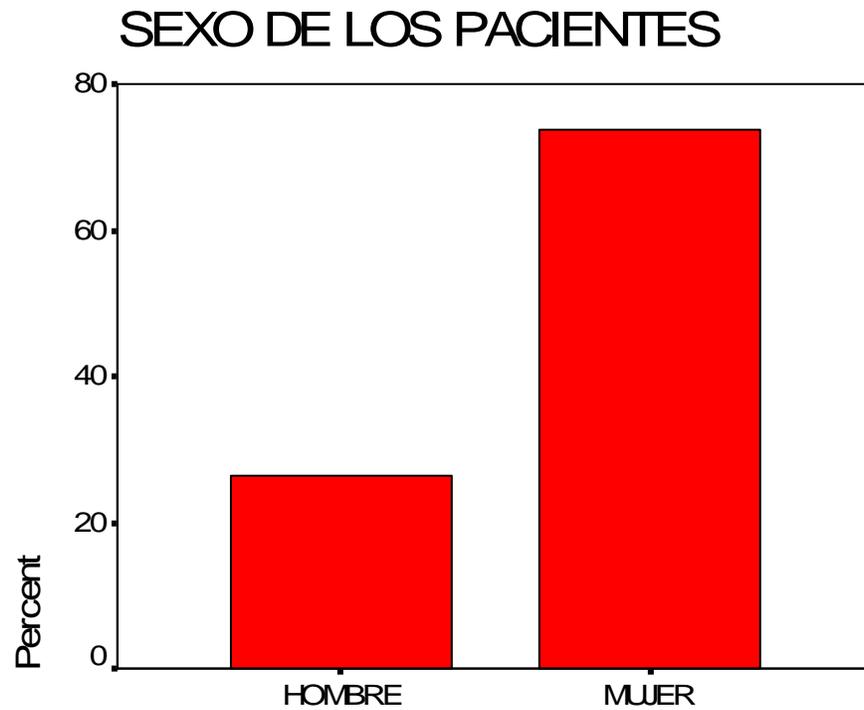
## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de las variables se guardaron y analizaron en el Programa SPSS Versión 10.0. Se realizó estadística descriptiva para cada una de las variables utilizando promedio, desviación estandar, media, mediana para las variables continuas y frecuencias y porcentaje para las variables nominales. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson, y T de student para variables paramétricas. Y ji cuadrada para variables paramétricas. Se consideró significancia estadística un valor de P de 0.05.



Gráfica 1

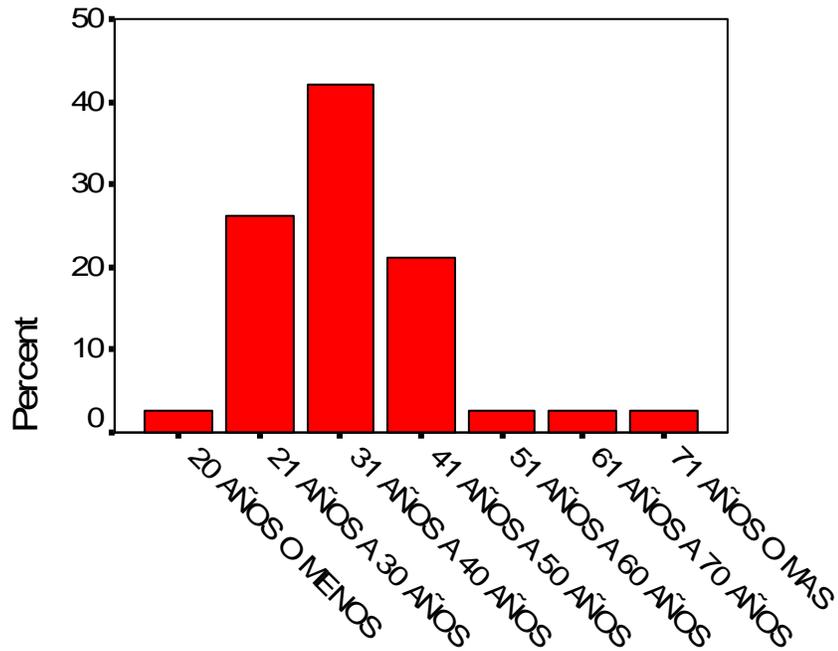
Se incluyeron 19 ( 50% ) pacientes con EREA, 12 ( 31.6% ) con rinitis y/o asma tolerantes y 7 ( 18.4 % ) sanos.



Gráfica 2

La distribución por sexo fué 26.3% hombres ( 10 ) y 73.7 mujeres ( 28 ), lo cual concuerda con la literatura con un predominio en sexo femenino. La relación mujer-hombre fué de 2.8:1.

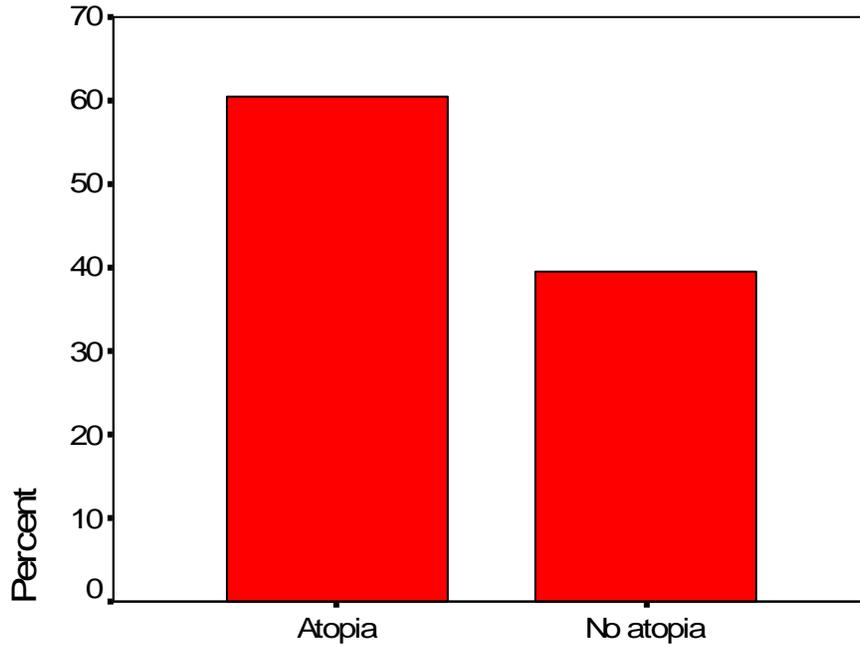
## EDAD DE LOS PACIENTES



Gráfica 3

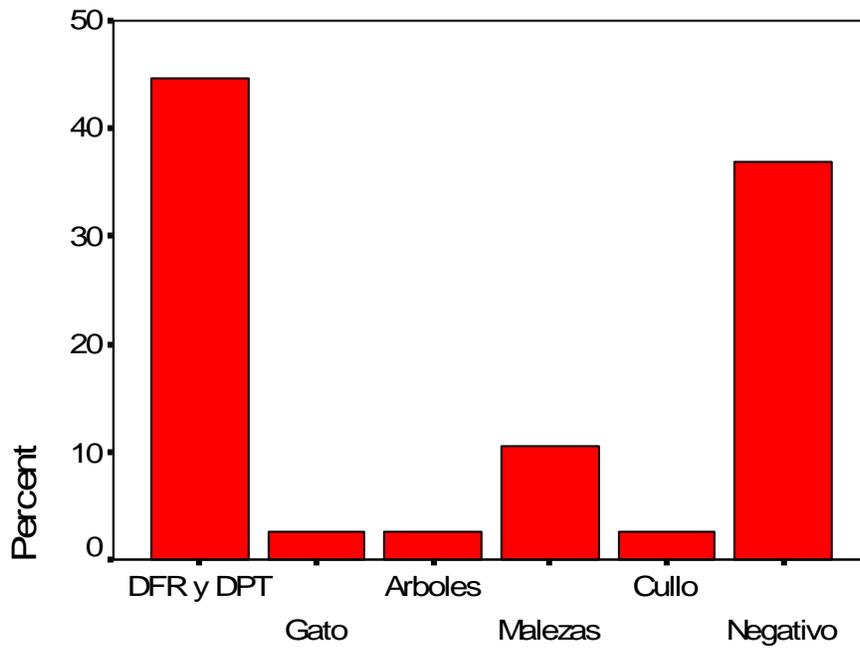
El 89.5% de los pacientes se encontró en el rango de los 20 y 50 años de edad, siendo predominantemente entre de los 30 a los 40 años. Siendo la media de 36 años y el rango entre los 18 y 72 años.

## ATOPIA Y NO ATOPIA

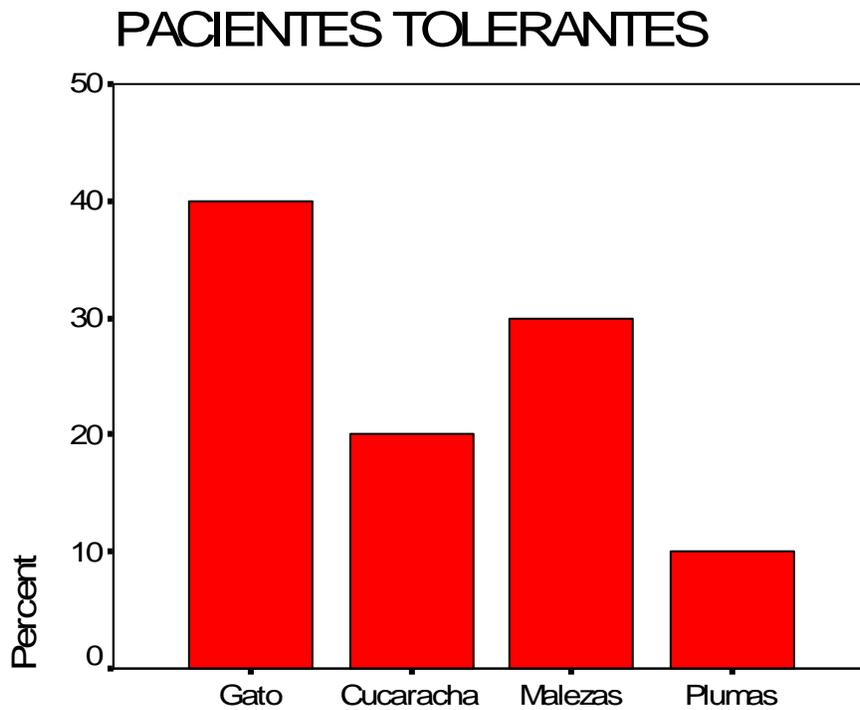


Gráfica 4

## PACIENTES CON EREA

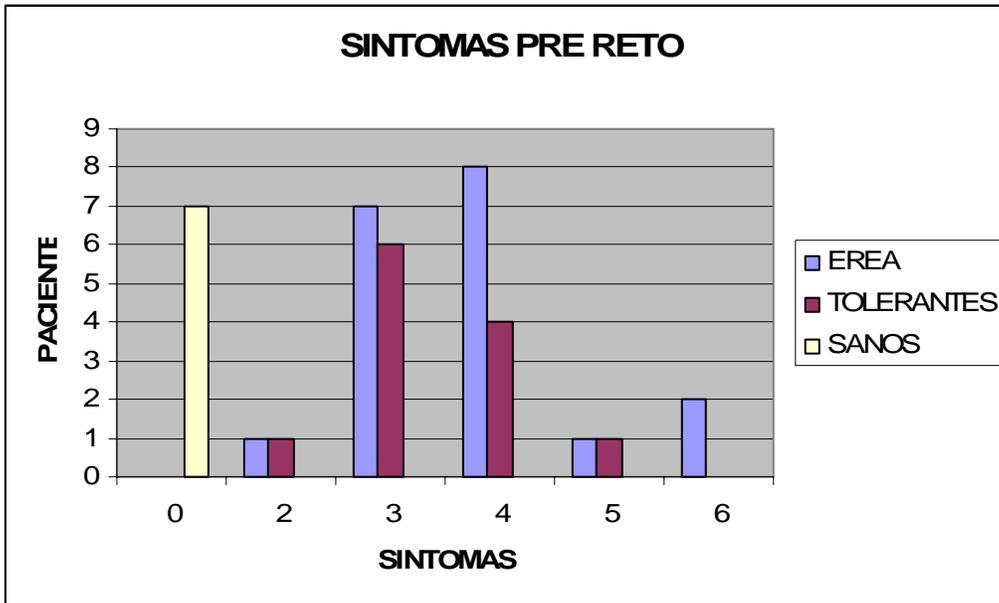


Gráfica 5

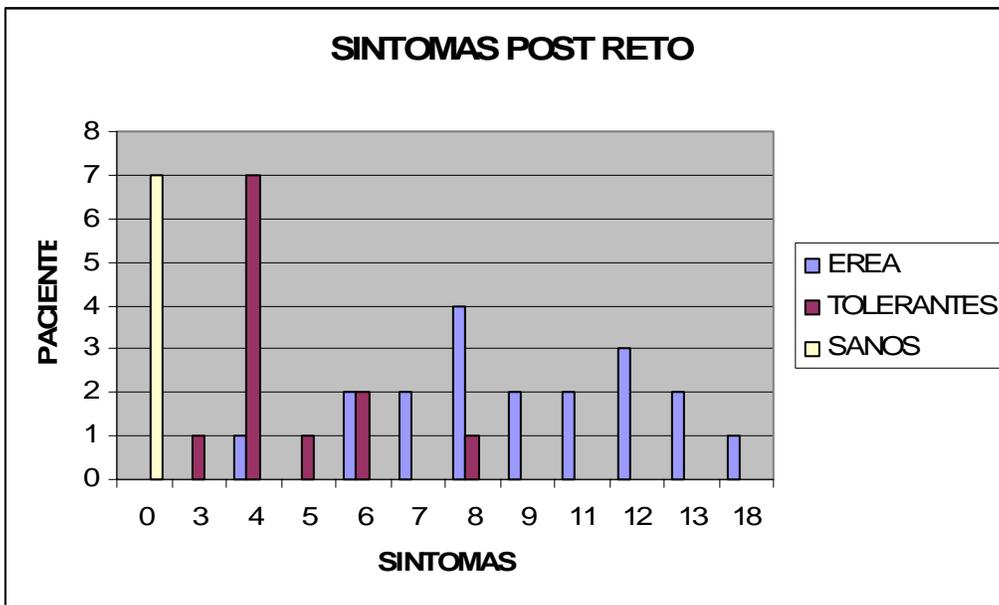


Gráfica 6

El 60.5% del total de pacientes presentó atopía. En los pacientes con EREA el 63.15% presentó atopía lo cuál no concuerda con la literatura en la cuál la mayoría son no atópicos. El alérgeno más frecuentemente encontrado fue polvo 44.7% y gato 13.1% en los grupos de EREA y Tolerantes respectivamente , como se ve en las tablas 5 y 6.

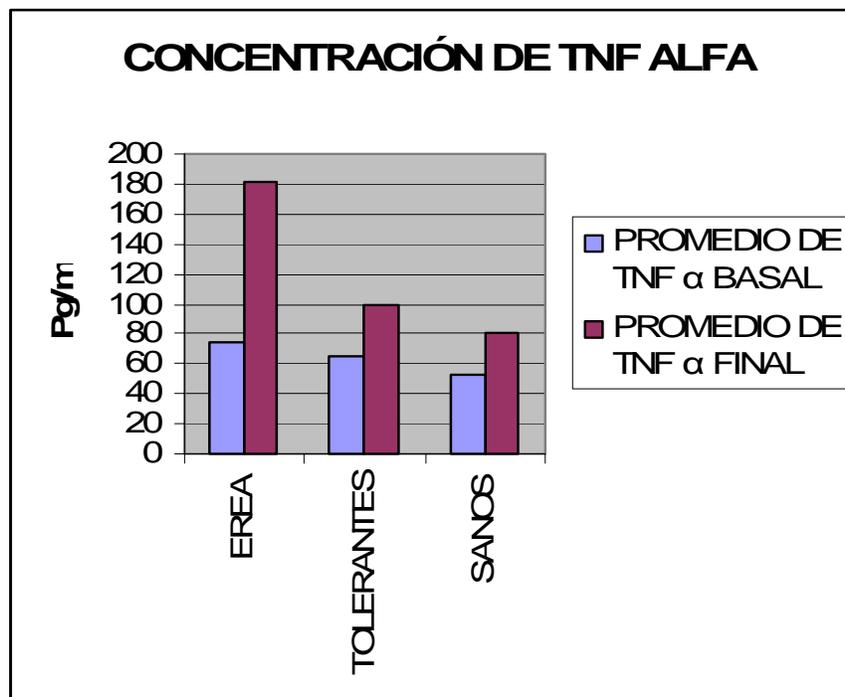


Gráfica 7



Gráfica 8

La evaluación clínica se realizó con la escala de Rojas previamente validada en donde se encontró que el mayor porcentaje de síntomas y severidad de los mismos fué más alta en los pacientes con EREA tanto basal como posterior al reto nasal con L-ASA. Se realizó correlación de los niveles de TNF $\alpha$  con síntomas encontrando que a mayor TNF $\alpha$  mayor presencia de síntomas, con una r-Pearson de 0.835.



Gráfica 9

	PROMEDIO DE TNF $\alpha$ BASAL	PROMEDIO DE TNF $\alpha$ FINAL
EREA	75 pg/ml	182 pg/ml
TOLERANTES	64.4 pg/ml	100 pg/ml
SANOS	52 pg/ml	81 pg/ml

Tabla 2

El TNF $\alpha$  en los lavados nasales se encontró más elevado en forma basal en los pacientes con EREA que los controles tolerantes y sanos. Y posterior al reto con L-ASA se evidenció un elevación en todos los grupos, sin embargo, el valor más alto fué en los pacientes con EREA, incrementándose 2.4 veces con respecto al basal siendo estadísticamente significativo con un valor de P de 0.001.

## **XII- DISCUSIÓN**

La citocina proinflamatoria TNF $\alpha$  tiene un papel fundamental en todas las enfermedades inflamatorias y en algunas auto-inmunes. En este estudio se evidenció que este juega un papel importante en La Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina a nivel local, encontrándose más elevado que los pacientes tolerantes y sanos a nivel basal e incrementándose significativamente posterior al reto nasal con L-ASA, al igual que otras citocinas como RANTES, Eotaxinas , MCP y MIP demostrado en estudios previos. Esto pudiera tener relación con la cronicidad de la enfermedad y la severidad de los síntomas, y probablemente con la rinosinusitis persistente y la formación de polipos nasales.

En la literatura se ha reportado que la provocación nasal es una alternativa dx , de bajo riesgo, comparándolo con la provocación oral o bronquial.

Los pacientes con EREA presentaron mayor cantidad de síntomas y mayor severidad de los mismos según la escala de Rojas, y estos se incrementaron hasta 2 veces más en nuestro estudio, posterior al reto nasal.

Llama la atención la alta prevalencia de atopia en nuestro grupo de estudio cuando en la literatura anterior se ha reportado que en la atopia no es frecuente en esta enfermedad. Dos pacientes del grupo control sano presentaron atopia, sin presentar síntomas pre y post reto nasal, sin embargo, el nivel del TNF $\alpha$  se incrementó posterior al reto por lo que también la atopia pudiera jugar un rol importante en el incremento del TNF $\alpha$  a nivel local.

Los alérgenos más frecuentemente encontrados que causan alergia en la población general es el polvo y el gato, y nuestro estudio mantiene esta frecuencia.

Creemos que el reto nasal específico con L-ASA es un procedimiento relativamente seguro, aunque siempre se debe de contar con la presencia de un carro rojo por cualquier eventualidad.

### **XIII- CONCLUSIONES**

Podemos concluir con este estudio que nuestra hipótesis de que el TNF $\alpha$  esta elevado basalmente y posterior al reto nasal específico con L-ASA en los pacientes con EREA, comparado con pacientes con Rinitis y/o Asma tolerantes y sanos es verdadera.

Se demostró en el estudio que la alta prevalencia de atopia en los pacientes con EREA de un 63.13% que no corresponde con lo que dice la literatura la cuál refiere que el 60% de los pacientes no tienen atopia.

Los pacientes con EREA tienen mayor cantidad y severidad de síntomas pre y post reto nasal que los pacientes tolerantes.

Solamente a una paciente los 19 con EREA con reto nasal específico con L-ASA tuvo caída del FEV1 al menos del 20% del basal, el cual revirtió con uso de esteroides y broncodilatadores de acción corta nebulizados en un 100% y en sus visitas posteriores para revisión estuvo con FEV1 arriba del 90%.

Una de las limitaciones del estudio es que utilizamos un grupo pequeño de pacientes, el cuál en un futuro se pudiera completar dándole seguimiento a este estudio o realizando otro con mayor número de pacientes.

## **XV- BILIOGRAFÍA**

- 1- Mathinson DA, Stevenson DD, Aspirin sensitivity in rhinosinusitis and asthma. *J Immunology Allergy Prac* 1983 5:17
- 2- Sousa A, Parikh A, Scadding G et al. Leukotriene-receptor expression on nasal mucosal inflammatory cells in aspirin-sensitive rhinosinusitis. *N Engl J Med* 2002; 347: 1493-99
- 3- Widal F, Lermoyes AP. Anaphilaxie e indiosyncrasie *Press Med* 1992, 30:180-90
- 4.- Samter M, Beers R. Intolerance to Aspirin . *Ann Int Med* 1986; 975-977.
- 5- Szczeklik A, Stevenson D. Aspirin-induced asthma: Advances in pathogenesis, diagnosis, and management. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(5)
- 6- Mc Fadden EA, Woodson TB et al. Orbital complications of sinusitis in the Aspirin Triad Syndrome. *Laryngoscope* 1996, 100:1103-1107
- 7- Kowalski ML, Sliwinks-Kowalska et al. Nasal secretions in response to acetylsalicylic acid. *J. Allergy Clin Immunol* 1993;91:560-598.
- 8- Sladek K, Dworski R, Soja J, et al. Eicosanoids in bronchoalveolar lavage fluid of aspirin-intolerant patients with asthma after aspirin challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 940-946
- 9- Nasser S, Lee T. Leukotrienes in aspirin-sensitive asthma. En: Szczeklik A, Gryglewski R, Vane J (editores). *Eicosanoids, aspirin and asthma*. New York: Marcel Dekker; 1998. p. 317-336
- 10- Ferreri N, Howland W, Stevenson D, Spiegelberg H. Release of leukotrienes, prostaglandins, and histamine into nasal secretions of aspirin-sensitive asthmatics during reaction to aspirin. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 847-854

- 11- Picado C, Ramis I, Roselló J, et al. Release of peptide leukotriene into nasal secretions after local instillation of aspirin in aspirin-sensitive asthmatic patients. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 65-69
- 12- Hamilos D, Leung D, Wood R, et al. Evidence for distinct cytokine expression in allergic versus nonallergic chronic sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 537-44
- 13- Nizankowska E, Duplaga M, Bochenek G, Szczeklik A. Clinical course of aspirin-induced asthma. Results of AIANE. In: Szczeklik A, Gryglewski R, Vane J, editors. *Eicosanoids, aspirin and asthma*. New York: Marcel Dekker; 1998. p. 451-471
- 14- Grzelewska-Rzymowska I, Rozniecki J, Szmidt M, Kowalski M. Asthma with aspirin intolerance. Clinical entity or coincidence of nonspecific bronchial hyperreactivity and aspirin intolerance. *Allergol Immunopathol Madr* 1981; 9: 533-538
- 15- Szczeklik A, Stevenson D. Aspirin-induced asthma: Advances in pathogenesis, diagnosis, and management. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(5)
- 16- Picado C. Nasal polyposis. *Clin Exp Allergy Rev* 2001; 1:163-165
- 17- Steinke J, Bradley D, Arango P, et al. Cysteinyl leukotriene expression in chronic hyperplastic sinusitis-nasal polyposis: Importance to eosinophilia and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 342-9
- 18- Black, R. A.; Rauch, C. T.; Kozlosky, C. J.; Peschon, J. J.; Slack, J. L.; Wolfson, M. F.; Castner, B. J.; Stocking, K. L.; Reddy, P.; Srinivasan, S.; Nelson, N.; Boiani, N.; Schooley, K. A.; Gerhart, M.; Davis, R.; Fitzner, J. N.; Johnson, R. S.; Paxton, R. J.; March, C. J.; Cerretti, D. P. :  
A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385: 729-733, 1997.
- 19- Baker, E.; Chen, L. Z.; Smith, C. A.; Callen, D. F.; Goodwin, R.; Sutherland, G. R. :  
Chromosomal location of the human tumor necrosis factor receptor genes. *Cytogenet. Cell Genet.* 57: 117-118, 1991.

20- Skoog, T.; van't Hooft, F. M.; Kallin, B.; Jovinge, S.; Boquist, S.; Nilsson, J.; Eriksson, P.; Hamsten, A. : A common functional polymorphism (C-A substitution at position -863) in the promoter region of the tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene associated with reduced circulating levels of TNF-alpha. *Hum. Molec. Genet.* 8: 1443-1449, 1999.

21- Nedwin, G. E.; Naylor, S. L.; Sakaguchi, A. Y.; Smith, D.; Jarrett-Nedwin, J.; Pennica, D.; Goeddel, D. V.; Gray, P. W. : Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res.* 13: 6361-6373, 1985

22- Winchester, E. C.; Millwood, I. Y.; Rand, L.; Penny, M. A.; Kessling, A. M. : Association of the TNF-alpha-308 (G-A) polymorphism with self-reported history of childhood asthma. *Hum. Genet.* 107: 591-596, 2000.

23- Vielhauer, V.; Stavrakis, G.; Mayadas, T. N. :Renal cell-expressed TNF receptor 2, not receptor 1, is essential for the development of glomerulonephritis. *J. Clin. Invest.* 115: 1199-1209, 2005.

50.-Srirupa Mukhopadhyay, John R Hoidal, and Tapan K Mukherjee Role of TNF $\alpha$  in pulmonary pathophysiology  
*Respir Res.* 2006; 7(1): 125. 1-13.

24- Srirupa Mukhopadhyay, John R Hoidal, and Tapan K Mukherjee Role of TNF $\alpha$  in pulmonary pathophysiology  
*Respir Res.* 2006; 7(1): 125. 1-13.

25- Witkamp R, Monshouwer M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. *Vet Q.* 2000;22:11–16

26- Corda S, Laplace C, Vicaut E, Duranteau J. Rapid Reactive Oxygen Species Production by Mitochondria in Endothelial Cells Exposed to Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Is Mediated by Ceramide. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24:762–768

27- Ferro TJ, Hocking DC, Johnson A. Tumor necrosis factor-alpha alters pulmonary vasoreactivity via neutrophil-derived oxidants. *Am J Physiol.* 1993;265:L462–471.

28- Kips TC, Tavemier J, Pawels RA. TNF causes bronchial hyperresponsiveness in rats. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:332-336.

29- Kim J, Mc Kinley L, Natarajan S, Bologos GL, Siddiqui J, Coperland S, Remick DG. Antiodu TNF $\alpha$  treatment reduces pulmonary inflammation and metacholine hyperresponsiveness in a murine asthma house dust. *Clin Exp Allergy* 2000;36:122-132

30- Rennezetti LM, Pacionek PM, Jannu SA, Rinaldi NC, Tocker JE, Wasserman MA, Gater PR. Pharmacological evidence for TNF as a mediator of allergic inflammation in the airways. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;278:847-853

31- Thomas Ps, Yates DH. TNF $\alpha$  increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am J. Crit Care Med* 1995;152:76-80

32- Thomas PS, Heywood G. Effects of inhaled TNF $\alpha$  in subjects with mild asthma. *Thorax* 2002;57:774-778.

33- Howarth PH, Babu KS, Arshad HS, Lau L, Buckley M, Mc Connell W, Beckett D, AL Ali M, Chauhan A, Wilson SJ, Reynolds A, Davies DE, Holgate SY. Anti TNF $\alpha$  as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. *Thorax* 2005;60:1012-1018

34- Berry MA, Hargadon B, Shelly M, Parker D, Shaw DE, Green RH, Bradding P, Brightling CE, Wardlaw AT, Pavord ID. Evidence of the role of TNF $\alpha$  in refractory asthma. *N. Eng J. Medicine* 2006;354:697-708.

35- Johnson SR, Knox AJ. Synthetic functions of airway smooth muscle in asthma. *Trends Pharmacol Sci.* 1997;18:288-292.

36- Amrani Y, Lazaar AL, Hoffman R, Amin K, Ousmer S, Panettieri RA Jr. Activation of the p55 TNFR1 coupled to TRAF2 stimulates ICAM-1 expression by modulating a thapsigargin-sensitive pathway in human tracheal smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* 2000;58:237–245.

37- Amrani Y, Lazaar AL, Hoffman R, Amin K, Ousmer S, Panettieri RA Jr. Activation of the p55 TNFR1 coupled to TRAF2 stimulates ICAM-1 expression by modulating a thapsigargin-sensitive pathway in human tracheal smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* 2000;58:237–245.

38- Yang S, Robinson DS, Varney V, Meng Q, Tcicopoulos A;Moqbel R, Durham SR, Kay AB, Hamid Q. TNF alpha m RNA expression in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* 1991;21:745-750.

39- Henrik Widegren, Magnus Korsgren, Morgan Andersson, Lennart Greif. Effects of Tumor necrosis factor alpha on the human nasal mucosa in vivo. Department of Otorinolaryngology, Head and Neck surgery and Clinical Pharmacology 2006: 1-14.

40- Henrik Widegren, Magnus Korsgren, Morgan Andersson, Lennart Greif. Effects of Tumor necrosis factor alpha on the human nasal mucosa in vivo. Department of Otorinolaryngology, Head and Neck surgery and Clinical Pharmacology 2006: 1-14.

41- Milewski M, Mastalerz L, Nizankowska E, Szczeklik A. Nasal provocation test with lysine-aspirin for diagnosis of aspirin-sensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 581-6

**PROTOCOLO ASMA INDUCIDA POR ASPIRINA  
REGISTRO DE PACIENTES**

FECHA:							
HOSP. DE PROCEDENCIA:				EXPEDIENTE:		PROTOCOLO:	
A. PATERNO		A. MATERNO		NOMBRE (S)		EDAD	SEXO
DOMICILIO: CALLE				NÚMERO EXTERIOR E INTERIOR		COLONIA	TELÉFONO
DX. RESPIRATORIO:				DX. SISTÉMICO:			
PRUEBAS CUTÁNEAS							
ALERGENO	HABÓN (mm)	ERITEMA (mm)	ALERGENO	HABÓN (mm)	ERITEMA (mm)	PESO (Kg)	TALLA (cm)
DPT CF			PASTO			RETO CON LISIL-ASPIRINA	
GATO			PASTO2				%
CUCHAR			ARBOLES				%
PERRO			ARBOLES2				%
CABALLO			ARBOLES3				%
CONEJO			MALEZAS				%
CULLO			MALEZAS2				%
MOSQUITO			MAIZ				%
VACA			LECHE				%
PLUMAS			HUEVO				%
			HONGOS				%

**CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE ROJAS-RAMOS  
PRE-RETO / POST-RETO CON LISIL-ASPIRINA**

RINORREA	0:NO	1:LEVE	2 MODERADA	3:SEVERA
ESTORNUDOS	0:NO	1:(1-5)	2 (6-10)	3:(11+)
PRURITO	0:NO	1:LEVE	2 MODERADO	3:SEVERO
OBS. NASAL	0:NO	1:LEVE	2 MODERADO	3:SEVERO
COLOR FACIAL	0:r	1:R LEVE	2 R MODERADO	3:R INTENSO
CID TAMAÑO	0:NV	1:VISIBLE 1/3	2 VISIBLE 2/3	3:OCLUSIVO
CID COLOR	0:r	1:P/R LEVE	2 P/R MODERADO	3:P/R/C
CII TAMAÑO	0:NV	1:VISIBLE 1/3	2 VISIBLE 2/3	3:OCLUSIVO
CII COLOR	0:r	1:P/R LEVE	2 P/R MODERADO	3:P/R/C
CONJUNTIVA	0:r	1:R LEVE	2 R MODERADO	3:R INTENSO

r=ROSA R=ROJO P=PALIDO C=CIANÓTICO NV=NO VISIBLE

TOTAL PRE-RETO=		TOTAL POST-RETO=	
MEDICAMENTOS EN LAS 6 ÚLTIMAS SEMANAS			
		ESPIROMETRIA	
		FVC	%
		FEV1	%
		FEV1/VC	%
		RINOMANOMETRIA	
		PRERETO	POSTRETO
		DER. IZQ.	DER. IZQ.
		FLUJO	
		RESISTENCIA	

CONTROL DE MUESTRAS						
ESPECIMEN	VOLUMEN	FECHA MUESTRA	CANT. DE TUBOS	FECHA DE PROCESO	CLAVE DE CONTROL	UBICACIÓN FÍSICA DE LA MUESTRA

REGISTRO DE REVISIÓN DE PROTOCOLO

REGISTRO DE AUDITORÍA DE PROTOCOLO

## ANEXO 2

1 de 3

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

### FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

### DETERMINACION DE TNF $\alpha$ EN LA ENFERMEDAD RESPIRATORIA EXACERBADA POR ASPIRINA (EREA)

México D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 2006

Señor (a):

Le invitamos a participar en este proyecto de investigación concerniente a la expresión de esta citocina en lavados nasales de pacientes con enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina y en pacientes tolerantes ya sea con asma o con rinitis el estudio se realizará en una población comprendida de 18 a 70 años de edad. Las muestras obtenidas sólo serán utilizadas para este protocolo y en caso de ser útiles para otro estudio se le notificará por escrito para que dé su consentimiento.

En este estudio se incluirán 16 pacientes con intolerancia a la aspirina y 16 pacientes con tolerancia a la aspirina del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Este estudio se realizará según las reglas de la Declaración de Helsinki

Su participación es VOLUNTARIA y CONFIDENCIAL, no alterará los cuidados médicos que podría necesitar.

*NO PUEDE PARTICIPAR EN ESTE PROYECTO SI USTED ENCUENTRA EMBARAZADA, CON USO DE BETABLOQUEADORES Y SÍNTOMAS SEVEROS DE ALERGIA, ASMA INESTABLE O ANGINA INESTABLE*

i

¿CUAL ES EL OBJETIVO DEL ESTUDIO?

Determinar si el TNF $\alpha$  se libera localmente en las vías aéreas superiores de pacientes con enfermedad respiratoria exacerbada por ácido acetilsalicílico.

¿QUÉ pasa si tomo la decisión de participar?

Se le realizarán estudios de apoyo al diagnóstico dentro de los cuales son:

**ESPIROMETRÍA:** Estudio que permite la medición de la cantidad de aire que sale de sus pulmones después de una inspiración máxima .Con una duración aproximada de 10 minutos. Este estudio nos permite medir el efecto de la enfermedad sobre su función pulmonar.

**RINOMANOMETRÍA:** Estudio que permite la medición del flujo de aire a través de las fosas nasales; dura aproximadamente 10 minutos, con este estudio medimos el efecto de la enfermedad que ocupa espacio dentro de la nariz como POLIPOS NASALES que nos condiciona obstrucción.

**RETO CON LISIL ASPIRINA: EL ASMA INDUCIDO POR ASPIRINA** se caracteriza por una reacción de las vías aéreas tras la administración de ésta u otro antiinflamatorio no esteroideo, siendo una sustancia usada en todo el mundo.

**Es un estudio de provocación nasal específica ampliamente utilizado en pacientes, que permite monitorizarse con facilidad mediante el control de los flujos y resistencias nasales.**

**PRUEBAS CUTÁNEAS:** Evalúa si existe relación entre los síntomas que padece con alergia a animales, pastos y malezas.

**Versión 1**

2 de 3

## **DETERMINACION DE TNF $\alpha$ EN LA ENFERMEDAD RESPIRATORIA EXACERBADA POR ASPIRINA (EREA)**

**PRUEBAS CUTÁNEAS:** Evalúa si existe relación entre los síntomas que padece con alergia a animales, pastos y malezas.

¿Cuáles son mis responsabilidades?

Dentro de sus responsabilidades se encuentran asistir a su cita puntualmente,,además de suspender el uso de sus esteroides una semana antes tanto locales como inhalados además de suspender sus lavados nasales 2 días antes del estudio, además posterior al reto acudir a sus citas de control cada semana posterior durante tres semanas.

Antes de cada uno de los estudios se revisará al paciente por un médico alergólogo e inmunólogo para determinar si está en condiciones de realizarle dichos estudios. Se revisará al paciente a la una, dos y tres semanas posterior a los estudios.

¿Existe un riesgo?

**Los riesgos para la realización de reto con L aspirina pueden ser los siguientes:**

**1) Reactivación de los síntomas de su enfermedad como rinorrea hialina, constipación nasal, estornudos, epifora, hasta una crisis de asma, los cuales se revierten con uso de esteroides y broncodilatadores.**

**Los riesgos de pruebas cutáneas son los siguientes:**

**El riesgo de reacciones sistémicas con la prueba cutánea de prick es de 0.04% tal como crisis de asma.**

**Los efectos secundarios generalmente se tratan en el consultorio, sin necesidad de hospitalización**

**Si el médico considera que el estudio no es beneficioso para usted o pone en riesgo su vida, se suspenderá su participación en él.**

¿Existe un beneficio para mí?

**Por supuesto, ya que al recibir un diagnóstico preciso, conocerá el comportamiento de su enfermedad para un mejor control de la misma.**

¿Este ensayo tiene algún costo?

**Los estudios y revisiones son totalmente gratuitos para usted.**

¿Quién recibirá los resultados de este ensayo?

**Los resultados se darán a conocer a usted mediante una carta al finalizar el estudio. Y el acceso al expediente se hará respetando su privacidad y no se publicará su identidad de acuerdo a la ley.**

Versión 1

3 de 3

**DETERMINACION DE TNF $\alpha$  EN LA ENFERMEDAD RESPIRATORIA  
EXACERBADA POR ASPIRINA (EREA)**

¿Cuál es la duración del estudio?

La duracion del estudio será de un mes y tres semanas para donde se programaran sus citas cada semana

Si tomó la decisión de empezar el estudio, puedo cambiar de opinión

Puede Usted rechazar de participar en este estudio, darse de baja en cualquier momento, sin justificarse y nadie podrá oponerse a su voluntad. No existe ninguna obligación de participar y tiene toda la libertad para rechazar cualquier prueba.

Antes de firmar este consentimiento, haga Usted las preguntas que le parecen necesarias al médico , el cual está en la disposición para cualquier información adicional o aclaración relativa a dicho estudio.

CONSENTIMIENTO

Certifico haber leído este documento ( o que alguien me lo ha leído). Todas las explicaciones que me fueron dadas me han dejado satisfecho y tuve la oportunidad de hacer preguntas. Entendí perfectamente lo que va a pasar, los riesgos y el beneficio. Soy libre de darme de baja de este estudio en cualquier momento. Mi decisión de participar o no en el estudio no cambiará los cuidados médicos que me están proporcionando

ACEPTO PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO  
EN LAS CONDICIONES ANTES MENCIONADAS

*Apellido y Nombre del Voluntario*  
*Nombre del Testigo*

*Apellido y*

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

*Firma*

*Firma*

<i>Fecha:</i>	<i>Fecha:</i>
---------------	---------------

<i>Apellido y Nombre del Testigo</i> <b>MANUEL TERAN JUÁREZ ( Tel: 56655700)</b>	<b>DR. LUIS</b>
<i>INVESTIGADOR PRINCIPAL</i>	<i>(Radio 56299800 clave 154077)</i>
_____	
_____	
<i>Firma</i>	<i>Firma</i>
<i>Fecha:</i>	<i>Fecha:</i>

En caso de preguntas relacionadas con los derechos de participante del estudio, o en caso de creer haber sufrido una lesión como resultado de su participación en el protocolo contactarse con :**Dr. Guillermo Carvajal Sandoval, Presidente del Comité de Ciencia y Bioética**, INER , Tel 566-45-39 ext 110.

**Versión 1**