

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

**UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
“DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA”
CENTRO MEDICO NACIONAL “LA RAZA”**

**HIF-1 en células de vías respiratorias de
pacientes pediátricos con Asma y controles**

Tesis que para obtener el grado de
Especialista en Pediatría
Presenta:

Saúl Oswaldo Lugo Reyes

Tutora:
Sara Huerta Yépez

Guillermina J. Baay Guzmán
Consuelo Ruelas Vargas
César Raúl González Bonilla

**Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología
del CMN “La Raza”**

2006-2007



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. José Luis Matamoros Tapia

Director de Educación e Investigación en Salud
UMAE Dr. Gaudencio González Garza
Centro Médico Nacional La Raza

Dr. Jorge E Menabrito Trejo

Jefe de la División de Pediatría
UMAE Dr. Gaudencio González Garza
Centro Médico Nacional La Raza

Dr. Mario González Vite

Coordinador General del curso de Especialización en Pediatría
UMAE Dr. Gaudencio González Garza
Centro Médico Nacional La Raza

Dra. Sara Huerta Yépez

Investigadora titular del IMSS
Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología
Centro Médico Nacional La Raza

Saúl Oswaldo Lugo Reyes

Alumno del curso de Especialización en Pediatría
UNAM - UMAE Dr. Gaudencio González Garza
Centro Médico Nacional La Raza

AGRADECIMIENTOS

QFB Berenice Sánchez Arellano,
Unidad de Investigación Médica en Infectología e Inmunología (UIMII), CMN La Raza

Angeles, Bernardo, Melissa y Juan Carlos,
UIMII, CMN La Raza

DEDICADO A

Miriam Sosa Arce,
por el apoyo.

CONTENIDO

1. Resumen	5
2. Introducción	7
3. Antecedentes	15
4. Planteamiento del problema	17
5. Pregunta de investigación	17
6. Justificación	18
7. Objetivos	19
8. Hipótesis	19
9. Diseño	20
10. Métodos	20
a. Escenario y población	23
b. Criterios de selección	23
c. Tamaño de la muestra	25
d. Procedimientos y mediciones	26
e. Análisis estadístico	28
11. Consideraciones éticas	28
12. Resultados	29
13. Discusión	33
14. Referencias	35

RESUMEN

AUTORES: Lugo-Reyes SO, Baay-Guzmán GJ, Ruelas-Vargas C, González-Bonilla C, Huerta-Yepe S.

TÍTULO: HIF-1 en células de vías respiratorias de pacientes pediátricos con asma y controles.

ANTECEDENTES: El factor de transcripción HIF-1 se activa en hipoxia y promueve la activación de alrededor de 200 genes involucrados en la respuesta celular al stress. Se ha descrito elevado en numerosas patologías y condiciones, incluyendo diabetes mellitus complicada, tumores sólidos, enfermedad de Von-Hippel Lindau, arteriosclerosis, modelos de isquemia-reperfusión y síndrome de apnea obstructiva del sueño. Recientemente también se describió aumentada su expresión en biopsias pulmonares de pacientes adultos con asma. No se ha detectado su expresión en muestras de esputo inducido ni en líquido de lavado broncoalveolar en niños asmáticos. La importancia de detectarlo radica en la capacidad conocida de HIF-1 α para regular a VEGF y a la quimiocina pro-inflamatoria SDF-1, ambas involucradas en la remodelación pulmonar en el asma crónica. De encontrarse elevado, podría significar que HIF-1 α participa en la fisiopatología del asma, y que puede representar un blanco terapéutico en el futuro.

OBJETIVO: Detectar la expresión de HIF-1 α en células de vías respiratorias de pacientes pediátricos con asma y sin ella.

MÉTODOS: Previo consentimiento informado, se obtuvieron muestras de líquido de lavado broncoalveolar y esputo inducido, de 10 pacientes con diagnóstico de asma y 10 controles sin asma, de entre 5 y 15 años de edad. Se prepararon laminillas por centrifugación y se realizó inmunocitoquímica con anticuerpo comercial contra HIF-1 α , para detectar su expresión en las células obtenidas (principalmente células epiteliales y macrófagos).

Para el análisis estadístico se utilizó U de Mann-Whitney, para comparar las medias de expresión en células por ciento entre ambos grupos. Los cálculos se obtuvieron con el paquete estadístico SPSS 11.0 para Windows; las gráficas con Prisma Graphic.

RESULTADOS: Se analizó la expresión de HIF-1 alfa en 25 pacientes; 10 controles y 15 asmáticos. La media de expresión en pacientes asmáticos fue de 4.5 ± 3.37 células positivas por cada 100, contra 1.3 ± 1.42 en pacientes sin asma ($p < 0.05$). Se encontró un gradiente de mayor expresión a mayor grado de severidad del asma. La diferencia fue significativa entre asma severa y asma leve, o el grupo sin asma.

DISCUSIÓN: La expresión de HIF-1 α es mayor en pacientes con asma severa o moderada, comparada con pacientes con asma leve o sin asma. Esto concuerda con reportes en modelos murinos de asma y en adultos asmáticos. HIF-1 alfa podría estar desempeñando un papel destacado en la fisiopatogenia del asma crónica. Se necesitan estudios experimentales para corroborar esta asociación y demostrar una dirección causal.

ABREVIATURAS:

HIF: Factor de transcripción inducible en hipoxia (Hypoxia inducible factor)

HBS: Sitio de unión a HIF (HIF-binding sequence)

HRE: Elemento de respuesta a la hipoxia (Hypoxia response element)

SDF-1: Factor derivado del estroma (stromal-derived factor)

MCP-1: Proteína quimioatrayente de m (Monocyte-chemoattractant protein)

RANTES: Regulated upon activation, normally T-cell expressed and secreted

INTRODUCCIÓN.

Aproximadamente 300 millones de personas en el mundo padecen asma, y su prevalencia ha venido aumentando en 50% cada década ⁽¹⁾. En Norteamérica, 10% de la población tiene asma. En todo el mundo, aproximadamente 180,000 muertes anuales son atribuibles a esta enfermedad. En diferentes países occidentales se ha calculado el costo monetario del asma en 300 a 1300 dólares por paciente por año ⁽¹⁾.

En Pediatría el asma es la enfermedad crónica más prevalente ⁽²⁾. Es la principal condición crónica que amerita hospitalización en niños, y la que más ausencias escolares motiva ⁽³⁾.

En nuestro hospital, la incidencia calculada de asma es de 11/1000 niños por año, alrededor del 30% de la consulta mensual de Neumología Pediátrica, y 2% de la consulta total por especialidades del Hospital General de La Raza (datos no publicados).

-Fisiopatogenia

Su patogenia no ha sido esclarecida, pero se sabe que intervienen factores genéticos y ambientales. En el estudio de su fisiopatología también se ha avanzado. Más allá de los reportes clásicos de hipersecreción, broncoconstricción, edema y remodelación de las vías aéreas, hoy se sabe acerca de la participación de eosinófilos en el asma atópica, y del papel de los diferentes tipos de linfocitos e interleucinas, si bien no se comprenden del todo estas interacciones, y la mayoría de los datos provienen, hasta ahora, de estudios en modelos animales.

En la última década el interés se ha enfocado en el paradigma T_H1/T_H2 y su relevancia en la patogénesis del asma ⁽⁴⁾. Las respuestas T_H1 , caracterizadas por la secreción de IFN- γ e IL-2, están involucradas en infecciones, mientras que las respuestas T_H2 son responsables de la respuesta inflamatoria en la eliminación de parásitos extracelulares y en la enfermedad atópica, en las que se libera principalmente IL-4, IL-5 e IL-13. Se ha encontrado consistentemente un incremento de la producción de citocinas T_H2 en el asma.

-Quimiocinas

Para participar en la respuesta alérgica inflamatoria, el eosinófilo debe migrar de la circulación a la vía aérea. Esta y otras células inflamatorias siguen un gradiente químico de quimiocinas que los atrae al sitio de inflamación ⁽⁵⁾. El primer paso es el rodamiento celular en la superficie del endotelio, para lo cual necesitan de integrinas y adhesinas, y luego la transmigración por entre las células endoteliales, hacia el sitio de inflamación. Las integrinas se expresan constitutivamente en la superficie del eosinófilo, pero su estado de actividad es regulado por citocinas y quimiocinas.

Las quimiocinas RANTES (*regulated upon activation, normally T-cell excreted, and secreted*, o CCL5), MIP1 α (*macrophage inflammatory protein 1 alpha*) y las eotaxinas son fundamentales para conducir a los eosinófilos a la vía aérea ⁽⁶⁾. Estos quimioatrayentes son producidos por el epitelio, macrófagos, linfocitos y eosinófilos. Ya se han detectado estas y otras quimiocinas en células y tejido de vías aéreas de pacientes con asma ^(7, 8).

Berkman y cols. ⁽⁶⁾ encontraron que la expresión de ARNm de RANTES era mayor en las vías aéreas de asmáticos que en las de sujetos normales, y desde

entonces se ha confirmado en muchas ocasiones su papel destacado en la fisiopatología del asma y la migración de eosinófilos. Holgate y cols. ⁽⁷⁾ detectaron RANTES, MIP1 α y MCP-1 (*monocyte-chemoattractant protein 1*) en las vías aéreas de pacientes normales y asmáticos, dentro de las primeras 4 horas luego de reto aéreo con un alérgeno.

Otras quimiocinas elevadas en las vías aéreas de pacientes asmáticos y ratones con enfermedad respiratoria alérgica experimental, e involucradas en la fisiopatogenia del asma, son Eotaxina 2, MCP-2, MCP-3 y MCP-4, MDC, MIP-1 β , linfotactina y fractalkina ^(8, 9).

Los procesos de remodelación pulmonares, que incluyen a un rango amplio de células, contribuyen a la hipersecreción de moco y el engrosamiento de la pared de las vías aéreas, los cuales subyacen a la persistencia de la hiperreactividad bronquial. La evidencia reciente sugiere que también las células estructurales, incluyendo células epiteliales, endoteliales y músculo liso, son capaces de liberar quimiocinas y expresar receptores, de una manera que sugiere un papel regulador ⁽¹⁰⁾. SDF-1 (*stromal-derived factor 1*) es secretada por las células dañadas en inflamación o isquemia, y atrae a células madre al sitio de lesión ⁽²⁵⁾, favoreciendo su diferenciación hacia fibroblastos y contribuyendo así a la reparación del tejido. En asma, SDF-1 desempeña un papel destacado en la remodelación de las vías aéreas ⁽¹⁰⁾.

-Factores de transcripción

Los factores de transcripción son proteínas que se unen a secuencias regulatorias en el ADN, usualmente en la región promotora en el extremo 5', "río arriba" del gen blanco, para incrementar (o a veces disminuir) la tasa de transcripción génica. Esto resulta en síntesis proteica aumentada o disminuida, y en una función celular alterada.

En asma, hay una expresión aumentada de proteínas que están involucradas en la cascada inflamatoria, incluyendo citocinas, enzimas inflamatorias, receptores y moléculas de adhesión. La expresión incrementada de la mayoría de estas proteínas es el resultado de un aumento en la transcripción de genes; muchos de estos genes no se encuentran activos en células normales, pero son inducidos en asma ⁽⁵⁾.

Como ya se dijo, los cambios en la transcripción son inducidos por los factores de transcripción. Esto sugiere que dichos factores pueden jugar un papel clave en la fisiopatología del asma, ya que regulan la transcripción génica aumentada que es responsable de los mecanismos inflamatorios agudos y crónicos que caracterizan a esta enfermedad ⁽¹¹⁾.

Los corticosteroides son el tratamiento más efectivo para el control a largo plazo del asma ⁽²⁹⁾; activan a los receptores de glucocorticoides que son en sí mismos factores de transcripción, e inhiben a otros factores de transcripción para inhibir sus acciones ⁽¹²⁾.

Algunos de los factores de transcripción con un papel importante en la fisiopatología del asma son NF- κ B y STAT-6, fundamentales, en la producción de mediadores inflamatorios y en la respuesta inmune de tipo Th2 ⁽¹¹⁾. La comprensión del papel de los factores de transcripción en el asma ha arrojado nueva luz hacia el

complejo proceso inflamatorio crónico, incluyendo el mecanismo de acción de los corticoesteroides, y puede conducir a nuevos abordajes de tratamiento en el futuro.

-Factor inducible en hipoxia

El factor de transcripción inducible en hipoxia, o HIF, regula la activación de alrededor de 200 genes que participan en las respuestas celulares a hipoxia y stress ⁽¹³⁾. Dicho factor se activa en hipoxia tisular y también en respuesta a factores de crecimiento y algunas citocinas.

El sistema HIF actúa en todas las células, y regula directa e indirectamente a cientos de genes involucrados en respuestas funcionalmente diversas, tales como motilidad y diferenciación celular, metabolismo de la matriz celular, y angiogénesis; genes con respuestas contrastantes a hipoxia, como el gen de la eritropoyetina (EPO) inducible en forma masiva, contra genes de inducibilidad más modesta como los que codifican las enzimas glucolíticas; y genes que codifican proteínas con funciones opuestas, tales como factores de crecimiento y mediadores pro-apoptóticos ⁽¹⁴⁾.

HIF-1 es un heterodímero formado por la subunidad alfa (HIF-1 α) y la beta (HIF-1 β , ARNT). HIF-1 β es expresado constitutivamente, mientras que HIF-1 α , en condiciones normales, se mantiene en niveles indetectables por medio de una modificación post-traducciona: la hidroxilación de residuos de prolina y asparagina, llevada a cabo por hidroxilasas que actúan como los sensores celulares de oxígeno ⁽¹³⁾, y que permiten la unión de HIF-1 α con la proteína de Von Hippel-Lindau, la cual “marca” a HIF-1 α para ser destruido por el sistema ubiquitina-proteasoma.

En condiciones de hipoxia, las hidroxilasas que actúan como sensores de oxígeno (también conocidas como dioxigenasas) sufren fosforilación y se inactivan, lo que deja libre a HIF-1 α para translocarse al núcleo, donde se une al elemento de respuesta a hipoxia (HIF-response element, HRE) en los promotores de los genes que regula. (Figs. 1 y 2)

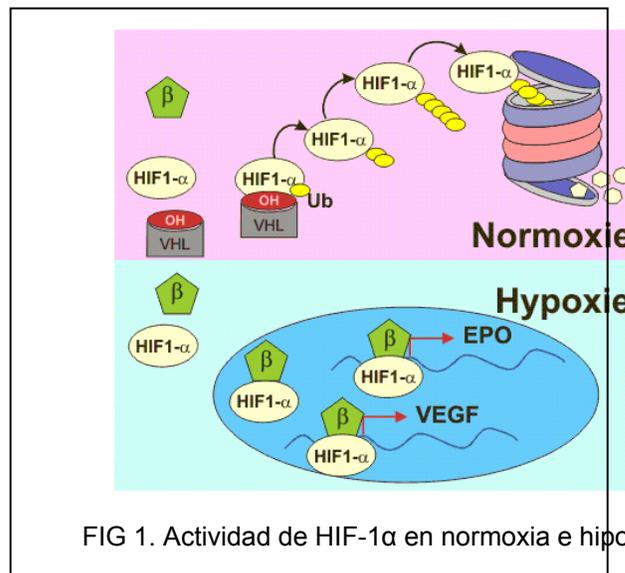


FIG 1. Actividad de HIF-1 α en normoxia e hipoxia.

Dicha activación en hipoxia ocurre aún en niveles “fisiológicos” de descenso en el oxígeno tisular ⁽¹⁵⁾, y HIF-1 α se acumula de manera exponencial en el citoplasma conforme la concentración de oxígeno desciende de 21 a 1%. En condiciones experimentales, cuando se recupera la normoxia HIF-1 α es degradado rápidamente, regresando a niveles indetectables en cuestión de minutos ⁽¹⁶⁾, pero cada vez se reconocen más situaciones de excepción, en los que HIF es activado por otros estímulos, a pesar de normoxia ^(13, 16, 17).

La secuencia consenso de ADN para la unión de HIF-1 (HIF-binding sequence, HBS): 5'-(A/G)CGTG-3', es común a varios genes cuya expresión es estimulada por la baja tensión de oxígeno ⁽¹³⁾.

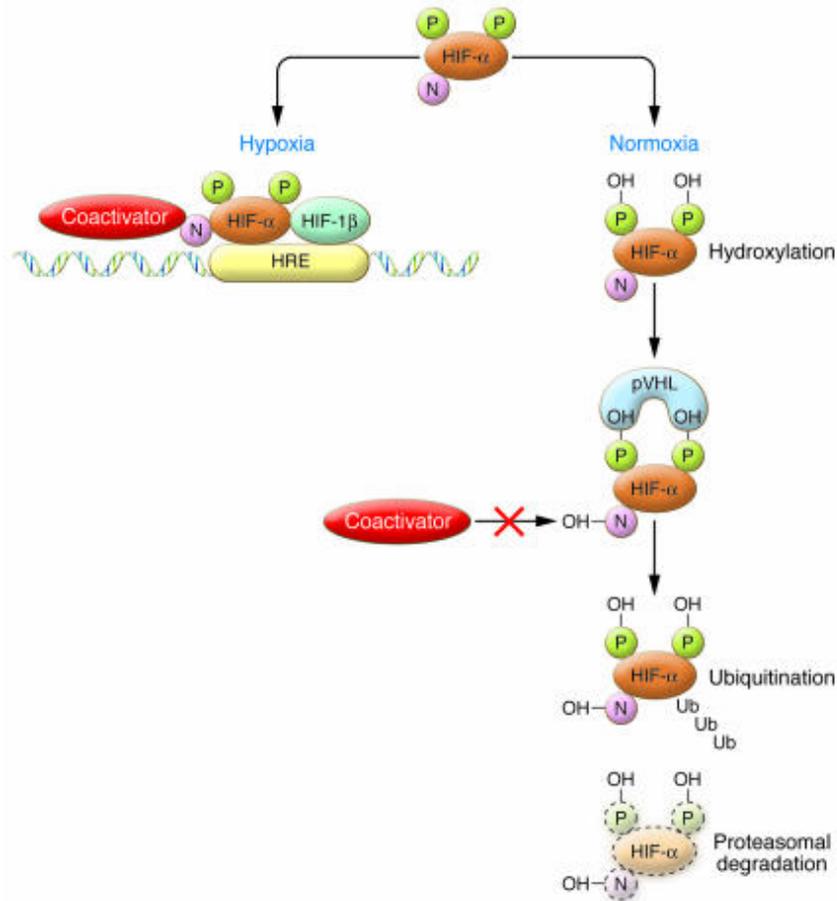


FIG 2. Regulación de HIF-1α en condiciones de normoxia e hipoxia

-Hipoxia y HIF en Asma

En 2004 un equipo de investigadores suecos ⁽¹⁸⁾ estudió alteraciones del proteoma en tejido pulmonar y lavado broncoalveolar de ratones asmáticos y controles. Varias de las proteínas que encontraron incrementadas en los ratones asmáticos están relacionadas con hipoxia y stress celular: enzimas glucolíticas, proteína regulada por glucosa de 78kD, prolyl-4-hidroxilasa, peroxiredoxina 1, y arginasa. Los investigadores

señalan la posibilidad de que la respuesta inflamatoria inducida en los ratones puede estar acompañada de la inducción de genes sensibles a hipoxia.

Los cambios en la expresión de genes durante la hipoxia son atribuidos principalmente al factor de transcripción HIF-1 α , el cual se activa durante la hipoxia y se une a elementos de respuesta a hipoxia (HRE) en los promotores de genes blanco ⁽¹³⁻¹⁸⁾. Por lo tanto podemos hipotetizar que la activación de HIF-1 α acompaña a la inflamación pulmonar alérgica.

Se ha documentado hipoxemia en niños durante las crisis asmáticas ^(19, 20), y en mujeres embarazadas con asma ⁽²¹⁾. Se sabe que la hipoxia/hipoxemia en asma condiciona una mayor hiperreactividad bronquial ⁽²²⁾, y que puede disminuir la percepción de disnea en niños y adultos con broncoespasmo ⁽²³⁾. Se ha descrito además un déficit neuropsicológico en niños asmáticos ⁽²⁴⁾, que no se puede atribuir a medicamentos u otros antecedentes, y que se cree relacionado con hipoxia tisular crónica.

El proceso de remodelación de las vías aéreas que acompaña al asma de larga evolución conlleva un engrosamiento del tabique alveolocapilar ⁽¹⁰⁾ y, junto con el edema e infiltración de la inflamación crónica, condiciona una mayor resistencia al intercambio gaseoso, por lo que es concebible que exista una disminución en la tensión tisular de oxígeno a ese nivel.

ANTECEDENTES.

En 2004 Fajardo y colaboradores, trabajando en un modelo murino de Enfermedad Respiratoria Alérgica, detectaron expresión incrementada de proteínas sensibles a hipoxia; asociadas con, o dependientes de, HIF-1 α ⁽¹⁸⁾. Este hallazgo sugiere que HIF-1 α puede acompañar a la inflamación alérgica.

Madjpour y colaboradores (2002) detectaron citocinas y quimiocinas proinflamatorias en lavados broncoalveolares de ratas sometidas a hipoxia ⁽²⁵⁾. Esto sugiere que la hipoxia, probablemente a través de HIF-1 α , es capaz de inducir la expresión de mediadores inflamatorios, incluyendo TNF α y MCP-1.

Ceradini y colaboradores ⁽²⁶⁾, en 2004 por primera vez demostraron que una quimiocina, SDF-1, es regulada por HIF-1 α . Su trabajo consistía en medir gradientes hipóxicos en un modelo de isquemia en ratones desnudos atímicos; empleando transfección de genes mutantes demostraron que HIF-1 α activa y regula a SDF-1, la cual a su vez recluta células progenitoras pluripotenciales al sitio de lesión.

Sun Lee y colaboradores ⁽²⁷⁾, en un modelo murino de enfermedad respiratoria alérgica (asma experimental en ratones) detectaron la expresión aumentada de HIF-1 en lavado broncoalveolar.

En diciembre de 2006, cuando el presente proyecto ya estaba en marcha, Lee y cols. ⁽²⁸⁾ reportaron por primera vez la expresión aumentada de HIF-1 en biopsias bronquiales de pacientes adultos con asma. Dicha expresión correlacionó positivamente con la expresión aumentada de VEGF, una citosina inductora de angiogénesis que desempeña un papel importante en la remodelación de vías aéreas.

Juntos, estos antecedentes sugieren que HIF-1 participa en la fisiopatogénesis del asma, probablemente activando la expresión de genes de mediadores inflamatorios.

A partir del conocimiento de que HIF-1 α es capaz de regular quimiocinas ⁽¹⁸⁾, en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología del IMSS se buscaron secuencias de promotores de otras quimiocinas, en bancos de genes publicados en línea. Se encontraron sitios putativos de unión específica para HIF en los promotores de las quimiocinas RANTES (CCL5), Eotaxina 2 (CCL13) y MCP-1 (CCL2). En dichos promotores se encuentra la secuencia consenso de unión a HIF, o HBS (HIF-binding sequence): 5'-(A/G)CGTG-3'.

Un primer paso para explorar estas relaciones, es detectar la expresión de HIF-1 α en vías aéreas de pacientes pediátricos con asma, comparada con niños sin asma.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen varios reportes de que el factor de transcripción inducible en hipoxia, HIF-1 α , está expresado en células en condiciones de inflamación, incluyendo un reporte reciente en biopsias bronquiales de adultos asmáticos.

Otros artículos sugieren que HIF-1 α incrementa la expresión de mediadores inflamatorios, incluyendo algunas citocinas, y que regula a por lo menos una quimiocina (SDF-1), en modelos de isquemia-hipoxia.

Se cree que en el asma puede haber hipoxia tisular crónica, condicionada por inflamación persistente y remodelación de las vías aéreas, y en niños con asma se han descrito déficits neurocognitivos atribuibles a hipoxemia intermitente e hipoxia cerebral.

Así pues, HIF-1 α podría estar elevado y activando genes de quimiocinas en asma infantil, y de esta manera perpetuando la inflamación crónica por una vía distinta a la respuesta Th2 y la hipersensibilidad mediada por IgE.

PREGUNTA DE INVESTIGACION.

¿Es diferente la expresión de HIF en las vías aéreas de pacientes pediátricos con asma y sin ella?

JUSTIFICACION.

El presente proyecto se propone confirmar un reporte reciente de expresión aumentada de HIF-1 α en asma, en esta ocasión en células obtenidas mediante esputo inducido de pacientes pediátricos con asma.

Sus resultados estarían aclarando un poco más el conocimiento de la fisiopatogenia del asma, y servirían como fuente de nuevas ideas y estudios. De comprobarse una expresión aumentada de HIF-1 α en asma, sugeriría un papel del factor de transcripción en la inflamación alérgica, que deberá demostrarse en estudios experimentales. Además se estaría señalando un potencial blanco terapéutico. Ya existen fármacos inhibidores de HIF-1 α para el tratamiento experimental del cáncer.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar si la expresión de HIF-1 α está aumentada en las vías aéreas de niños con asma.

Objetivo específico:

- Detectar y comparar la expresión de HIF-1 α en las vías aéreas de pacientes pediátricos con asma, y pacientes sin asma.

HIPOTESIS

La expresión de HIF-1 α en células epiteliales de vías respiratorias de niños asmáticos, se encontrará significativamente aumentada, al compararse con su expresión en las células epiteliales de vías respiratorias de niños sin asma.

DISEÑO.

Investigación básica.

Estudio transversal, observacional comparativo.

METODO.

En el Hospital General de La Raza, entre 2006 y 2007, se obtuvieron muestras de esputo inducido a 15 niños de entre 7 y 15 años con asma diagnosticada por un especialista (5 con asma leve, 10 con asma moderada a severa), y a 10 niños sin asma.

Las muestras de esputo inducido se procesaron para obtener laminillas por centrifugación (de 5 a 10 laminillas por paciente, con aproximadamente 50,000 células por laminilla), que se fijaron en formalina y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su utilización posterior.

En las laminillas se realizó Inmunocitoquímica para detectar la expresión del factor de transcripción HIF-1 α , empleando anticuerpos policlonales comerciales contra HIF-1 α (Santa Cruz, California), con incubación toda la noche y revelado con biotina/estreptavidina y peroxidasa de rábano/diaminobenzidina (DAB). Se consideró positiva la coloración café después del revelado con DAB, en el núcleo y/o el citoplasma de células epiteliales. Se contaron 200 células epiteliales, y se obtuvo el porcentaje de positividad (número de células positivas por cien células contadas).

Se excluyeron las muestras con más del 50% de células escamosas.

-Modelo conceptual

Variables a estudiar:

Expresión de HIF-1 α (dependiente o resultado)

Diagnóstico de asma, Severidad del asma (independiente o predictora)

Potencial confusora: Uso de corticosteroides inhalados.

Variables demográficas: Edad (en años cumplidos) y Sexo (masculino o fem.)

HIF-1 α

Definición conceptual: Factor de transcripción inducible en hipoxia 1, subunidad alfa. Proteína con capacidad de unirse al ADN y regular la activación de genes. Cuando es activado (por hipoxia o factores de crecimiento) se transloca al núcleo, donde se une al promotor de genes involucrados en la respuesta celular a hipoxia y stress.

Definición operacional: Positividad de expresión celular. En inmunocitoquímica el citoplasma o núcleo se tiñen de color café al revelar la unión de anticuerpos policlonales biotinilados de conejo.

Escala: Cuantitativa continua.

Indicadores: Porcentaje de células positivas por mm². Cantidad de pixeles positivos por campo, medidos mediante un programa de microfotografía.

Diagnóstico de asma

Definición conceptual: Enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas, generalmente de fondo alérgico, caracterizada por edema, hipersecreción de moco, broncoconstricción y remodelación, manifestada por tos, disnea y sibilancias, y un patrón obstructivo con respuesta a broncodilatador en la espirometría.

Definición operacional: Pacientes pediátricos con historia y síntomas compatibles de asma, diagnosticados por un especialista como asmáticos, en base a criterios internacionales ⁽²⁹⁾.

Escala: Cualitativa nominal dicotómica.

Indicadores: Sin asma, con asma (0 y 1).

Severidad de asma

Definición conceptual: En el momento del diagnóstico o con fines de investigación se utiliza todavía la clasificación de severidad del asma en cuatro: leve intermitente, leve persistente, moderada persistente y severa persistente, de acuerdo a la frecuencia de los síntomas, uso de medicamentos de rescate y grado de obstrucción en las pruebas de función respiratoria ⁽²⁹⁾.

Definición operacional: Se consideró moderada a severa si la frecuencia de síntomas en el último mes fue diariamente, o si su FEV1 o PEF es menor del 80% del predicho para la edad y talla.

Escala: Cualitativa ordinal.

Indicadores: “leve” (1) o “moderada a severa” (2).

POBLACIÓN

Pacientes entre 7 y 15 años que acudieron al Hospital General del CMN La Raza, en los servicios de Urgencias pediátricas y Consulta Externa (Alergología y Gastroenterología pediátrica), entre 2006 y 2007.

-Criterios de Selección

CRITERIOS DE INCLUSION:

- pacientes de entre 7 y 15 años
- con diagnóstico de asma establecido por un médico especialista en base a historia compatible y criterios internacionales ⁽²⁹⁾.
- o controles de la misma edad sin historia sugestiva de asma, que acudan a consulta por otro padecimiento no respiratorio.
- que accedan a participar mediante carta de consentimiento informado.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- pacientes con síntomas respiratorios sin un diagnóstico.
- retraso mental u otros padecimientos neurológicos que puedan condicionar hipoxia crónica.
- enfermedades inflamatorias sistémicas o infecciones respiratorias.
- pacientes asmáticos que en el último mes hayan utilizado esteroides sistémicos (orales o inyectables).

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN. Por tratarse de un estudio transversal no necesita criterios de eliminación.

Muestreo: No probabilístico, consecutivo.

-Tamaño de la muestra

Tomando en cuenta los hallazgos reportados por Lee y cols. en diciembre de 2006 ⁽²⁸⁾, se calculó una n para obtener un coeficiente de correlación de 0.6, así como una diferencia entre dos medias (asmáticos y no asmáticos) de más de 10 células por mm², empleando un programa estadístico de acceso libre (G-Power 3.0.8 para Windows, Alemania) ⁽³⁵⁾. Con dos grupos de 10 pacientes cada uno se tiene más del 80% de poder para detectar una diferencia significativa entre dos medias.

Para detectar diferencias en la expresión de HIF -1 α entre diferentes grados de severidad, se trabajó con 3 grupos de 15 pacientes cada uno para analizar diferencias entre tres medias utilizando ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis post-hoc).

-Procedimientos y Mediciones

Para obtener células a partir de esputo inducido:

El paciente debe ser capaz de expectorar. El esputo se induce mediante la inhalación de solución salina hipertónica (4.5%) estéril en aerosol, producido por un nebulizador ultrasónico portátil de flujo bajo (Medimetrics, China). Previa medicación inicial con salbutamol inhalado, se coloca un clip nasal y se respira el aerosol a través de una boquilla durante 3 períodos de 5 minutos cada uno, a máximo flujo (2ml/min). Al final de cada período se solicita al paciente que enjuague su boca y expectore. Si luego de 15 minutos de nebulización no ha conseguido expectorar una muestra suficiente, se puede intentar un período final de 5 minutos, para un total máximo de 20 minutos de nebulización.

Antes y después del procedimiento se mide el Flujo espiratorio máximo (PEF) para corroborar que sea mayor al 70% del predicho. El paciente puede intentar expectorar siempre que tenga la necesidad y al final de cada período de 5 minutos. Se le alienta a expectorar desde lo profundo del pecho y a no escupir con la boca. Entre un período y otro se inquiere al paciente acerca de molestias, se le pregunta si quiere continuar, y se ausculta el tórax posterior en busca de broncoespasmo. En caso de broncoespasmo o náusea se suspende el procedimiento. La muestra se recoge en un recipiente de vidrio limpio, y se transporta en hielo para ser procesada en las siguientes 2 horas. Se considera satisfactoria si se pueden contar al menos 500 células no escamosas, o si el porcentaje de células escamosas (provenientes de la boca) no rebasa el 50%.

Con este método se obtienen principalmente células epiteliales provenientes de las vías aéreas medianas (bronquios), aunque también puede encontrarse eosinófilos,

linfocitos y macrófagos. Se considera un método seguro y útil en investigación en niños y en aparato respiratorio ⁽³⁰⁻³⁴⁾.

Procesamiento de las muestras:

Las muestras se llevan al laboratorio de la Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología. A la muestra de esputo inducido se agrega un volumen igual (1:1) de DTT Dithiothreitol al 0.1% (Sputolysin, Calbiochem corporation, San Diego, Calif. EUA) para disolver el moco.

Las muestras se centrifugan a una velocidad de 1800 rpm por 15 minutos. Se separa el sobrenadante y el botón celular se resuspende en 1 ml de solución salina isotónica. Enseguida se cuentan las células bajo el microscopio óptico en la cámara de Neubauer, corroborando la viabilidad mediante la técnica de exclusión del azul de tripano.

Luego se ajusto la suspensión para generar alícuotas de aproximadamente 50,000 células, que se colocan en los recipientes del Cytospin. Se centrifuga a 1800 rpm por 8 minutos. Las laminillas así obtenidas se dejan secar al aire antes de fijarlas en formaldehído al 4% por 20 minutos a 4°C. Se almacenan etiquetadas en recipientes a temperatura ambiente para su tinción posterior.

Inmunocitoquímica:

A partir de los improntas celulares obtenidos en una citocentrífuga se realiza la recuperación de antígeno utilizando citrato de sodio (0.01 M pH 6.0) en baño maría a ebullición por 25 min. Se elimina la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno (3% por 25 min). Se bloquea con Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 1% en PBS por 60 min y las secciones se incuban toda la noche a temperatura ambiente con los anticuerpos anti-HIF-1 α (Santa Cruz, California) por separado a una dilución de 1:500 en PBS-BSA.

Después de lavarse las laminillas, se incuban con el segundo anticuerpo conjugado a biotina "Link" y después el conjugado streptavidina peroxidasa. Luego se revelan con DAB (diaminobencidina) por 2-7 min; se detiene la reacción con agua de la llave y se contratiñe con hematoxilina. Posteriormente se deshidrata con agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y xilol, 5 minutos en cada uno. El tejido se preserva con un medio de montaje permanente basado en xilol o tolueno.

Estandarización de las técnicas

En la primera etapa del estudio se realizó la estandarización de las técnicas de citoimmunohistoquímica por parte de los miembros del equipo de investigación encargados de preparar y procesar las muestras.

-Análisis estadístico

Los datos se recabaron en hojas de recolección (Apéndice C) y se capturan en una base de datos electrónica (Excel de Microsoft para Windows).

Estadística descriptiva (medidas de tendencia central y dispersión) para las variables demográficas. ANOVA con método post-hoc de Kruskal-Wallis (no paramétrico) para buscar diferencias entre tres grupos (asmáticos leves, moderados a severos, y no asmáticos).

Se consideró una p menor de 0.05 como significativa. Se empleó el paquete estadístico SPSS para Windows versión 11.0 para obtener cálculos, y Prisma Graphics para hacer gráficas.

CONSIDERACIONES ETICAS.

El proyecto se sometió a aprobación por el Comité local de Investigación en salud del Hospital General del CMN La Raza.

De acuerdo a la Ley General Mexicana el procedimiento se considera Riesgo superior al mínimo, por lo que se solicitó consentimiento informado firmado (Apéndice B) por el paciente y su cuidador.

Los autores declaramos no tener conflictos de interés.

RESULTADOS

Obtuvimos laminillas con muestras de 52 sujetos; 23 asmáticos y 29 controles. Veintinueve de ellas (55.8%) corresponden a varones, y veintitrés a mujeres. El promedio de edad es de 11.33 años. De los pacientes asmáticos, 10 tienen asma leve, 4 asma moderada, y 9 asma severa. Doce pacientes habían recibido corticosteroides inhalados recientemente.

Se trabajó con una sub-muestra de 25 pacientes para hacer las primeras inmunotinciones con HIF-1 α (fig. 1); 10 controles y 15 asmáticos. Catorce hombres (56%), edad promedio 9.25 años. De los pacientes asmáticos, 5 padecen asma leve, 4 asma moderada, y 6 asma severa. Ocho pacientes estaban recibiendo esteroides inhalados.

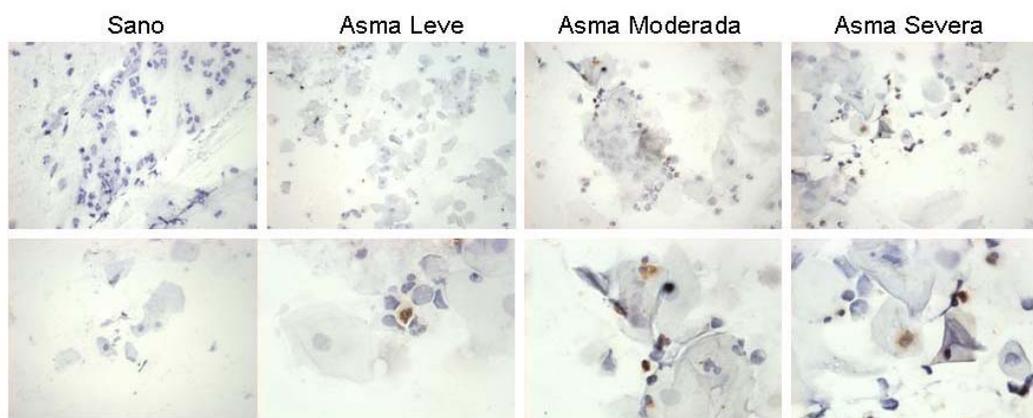


Figura 1. Fotografías representativas de células de vías respiratorias sometidas a inmunocitoquímica para HIF-1 α (1:500). Nótese la expresión nuclear en pacientes con asma moderada y severa. En contraste, las células de pacientes con asma leve muestran tinción citoplasmática, y en pacientes sin asma no se detectó expresión de HIF-1 α . Panel de arriba 40X. panel inferior 100X.

Para el análisis estadístico se empleó ANOVA de una vía, con la prueba post-hoc de Dunnett, tomando como control a los pacientes sin asma. La diferencia fue significativa ($p < 0.05$) para el grupo de asma severa, comparado con asma leve y el grupo sin asma (fig. 2). Las medias de expresión por grupo fueron: 1.4 ± 1.42 (sin asma), 2.6 ± 1.6 (asma leve), 5.3 ± 3.21 (asma moderada), y 8.25 ± 1.5 (asma severa) células positivas por ciento.

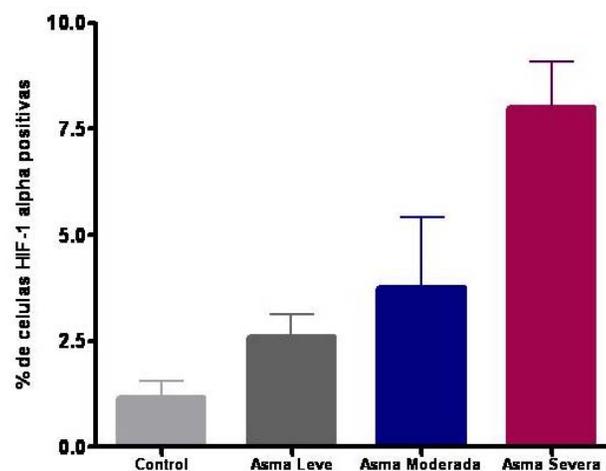


Figura 2. Porcentaje de células que expresan HIF-1 α en citoplasma, por grado de severidad de asma. Se contaron 200 células en cada laminilla. Se observó un aumento significativo de número de células positivas para HIF-1 α a nivel citoplásmico comparado con pacientes con asma leve y moderada, así como con controles sanos ($p < 0.05$ en la prueba de Mann-Whitney).

La distribución se mantuvo cuando se consideraron sólo las células con expresión de HIF-1 α en el núcleo (Fig. 3). La diferencia siguió siendo significativa sólo entre asma severa y controles, o entre asma severa y asma leve.

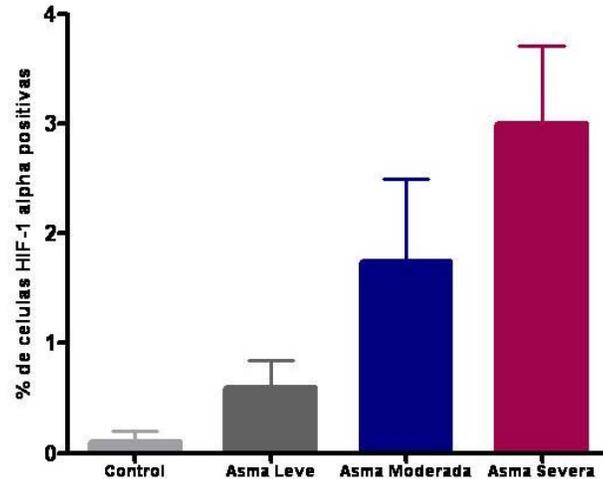


Figura 3. Porcentaje de células que expresan HIF-1 α en el núcleo, por grado de severidad de asma. Se contaron 200 células en cada laminilla. Se observó un aumento significativo de número de células positivas para HIF-1 α a nivel nuclear comparado con pacientes con asma leve y moderada, así como con controles sanos ($p < 0.05$ en la prueba de Mann-Whitney)

Si reagrupamos la variable de severidad de la enfermedad en “asma” y “controles sin asma”, las medias correspondientes para la expresión de HIF-1 α son 4.5 ± 3.37 , y 1.3 ± 1.42 , respectivamente, con una $p < 0.05$ en la prueba de Mann-Whitney.

De manera similar, si reagrupamos la variable en los grupos “asma moderada a severa”, comparado contra “asma leve y controles sin asma”, la diferencia en las medias de expresión es de 6.0 ± 3.09 para asma moderada a severa, contra 1.4 ± 1.4 para asma leve o controles sin asma, también significativa ($p < 0.01$).

En tres pacientes con crisis asmática se obtuvo una muestra de esputo inducido y se realizó inmunotinción para HIF-1 α , con la misma técnica. La media de expresión de HIF-1 α fue de 3.0, comparada con 1.6 de asma leve, y 1.3 de controles sin asma ($p < 0.05$).

Como se puede apreciar, HIF-1 α sólo está aumentado significativamente en pacientes con asma de moderada a severa, o durante exacerbación aguda de asma.

Al comparar la expresión de HIF-1 α en pacientes que utilizan corticosteroides inhalados (8 pacientes asmáticos), comparado con aquéllos que no lo utilizan (17 pacientes con asma leve), se obtienen medias de 5.12 ± 3.76 , en pacientes utilizando corticosteroides, y de 2.35 ± 2.49 , con un valor de p no significativo (0.087, IC 95% para la diferencia de -6.025 a 0.481).

DISCUSION

Encontramos una diferencia significativa entre las medias de expresión, cuantificada como número de células positivas por cien células contadas. De manera importante, detectamos un gradiente de expresión de HIF-1 α que va de menor a mayor grado de severidad de asma, tanto para expresión citoplasmática como para expresión nuclear.

Los resultados confirman los reportes de expresión incrementada de HIF-1 α en las vías aéreas de pacientes asmáticos. Este es el primer estudio en comparar la expresión de HIF-1 α en células de pacientes asmáticos y no asmáticos en población pediátrica.

Si la severidad del asma afecta la expresión de HIF-1 α , esperaríamos encontrar un gradiente de mayor expresión de acuerdo a mayor severidad, lo cual se corroboró en el presente trabajo. Cabe mencionar que estos hallazgos son consistentes con los encontrados en un modelo experimental de asma, en donde nuestro grupo de trabajo ha demostrado que a mayor severidad de inflamación alérgica pulmonar en ratones en donde se utiliza ovalbumina (OVA) como alérgeno, se observa un aumento de la expresión de HIF-1 α en tejido pulmonar.

Estos hallazgos sugieren que HIF-1 α podría tener un papel destacado en la fisiopatogenia del asma, regulando la actividad de citocinas y quimiocinas, y de esta manera perpetuando la inflamación crónica y remodelación que se observa en estos pacientes.

La adición de un inhibidor de HIF-1 α al régimen de tratamiento crónico del asma podría ofrecer mejores resultados a los pacientes con asma severa, de difícil control y resistente a esteroides.

Para demostrar concluyentemente un papel de HIF-1 α en la regulación de las quimiocinas estudiadas, y en la fisiopatogenia del asma, así como para probar el efecto de inhibidores farmacológicos de HIF-1 α , se necesitan estudios experimentales, que en este momento se están llevando a cabo por nuestro grupo de trabajo.

Anexo B. Hoja de recolección de datos

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS.

CORRELACION ENTRE LA EXPRESION Y ACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCION HIF-1 α Y LA EXPRESION DE LAS QUIMIOCINAS RANTES, EOTAXINA 2, MCP-1 Y SDF-1 EN CELULAS DE VIAS RESPIRATORIAS DE NIÑOS CON ASMA.

No. _____

NOMBRE _____
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Afiliación _____

Fecha broncoscopía (día/mes/año): _____

Complicaciones: _____

Edad (años / meses) _____ **Sexo:** Hombre () Mujer ()

Antecedentes Personales Patológicos: Inicio (años / meses) _____ Tratamiento (Medicamento tiempo de uso) _____

Infecciones (Urinarias, respiratorias, otras) Si () No () _____

Otra (s) enfermedad (es) Si () No() _____
Dx específico

VEF-1 _____

PEF _____

IgE sérica _____

Prueba de reacción cutánea _____

HIF-1 α _____ **RANTES** _____ **SDF-1** _____ **Eot-2** _____ **MCP-1** _____

Observaciones:

Anexo C. Carta de consentimiento Informado.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
Seguridad y Solidaridad Social

Ciudad de México, a _____ de 2006.

Por medio de la presente, autorizo que mi _____ participe en el proyecto de investigación titulado "EXPRESION DE HIF-1 α EN CÉLULAS DE VIAS RESPIRATORIAS DE NIÑOS CON ASMA", Registrado ante el Comité Local de Investigación en Salud con el número _____.

El objetivo de este estudio es detectar unas sustancias, que se sabe que participan en el Asma, en el líquido que se saca de hacer un lavado de los bronquios durante la broncoscopia, para tratar de demostrar una relación entre dichas sustancias y la severidad de la enfermedad.

Se me ha informado que mi participación consistirá en autorizar que se tome un poco más de muestra de este líquido de lavado pulmonar durante la broncoscopia, que de cualquier manera se va a realizar en mi paciente.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes: sólo los inherentes al estudio programado (broncoscopia), durante el cual se administrará un poco más de líquido para obtener otra muestra de lavado. Esto no altera el resultado del estudio ni modifica en nada la atención y el tratamiento de mi paciente.

El investigador principal se ha comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que yo le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo; los riesgos, beneficios, o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

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

Nombre y firma de los padres o del representante legal

Dr. Saúl Oswaldo Lugo Reyes, mat. 99152522

Unidad de Investigación Biomédica en Inmunología e Infectología. CMN La Raza. Tel. 5724-5900, ext. 24321

Testigos:

REFERENCIAS

1. Braman SS. The global burden of asthma. *Chest* 2006; 130 (1 Suppl): 4S-12S.
2. Pearce N, Douwes J. The global epidemiology of asthma in children. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10(2):125-132.
3. Fowler MG, Davenport MG, Garg R. School functioning of US children with asthma. *Pediatrics*. 1992;90:939-944.
4. Mackay IR, Rosen FS. Advances in immunology: Asthma. *N Engl J Med* 2001; 344(5): 344-62.
5. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 789-815.
6. Bisset LR, Schmid-Grendelmeier P. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. *Curr Opin Pulm Med* 2005; 11(1): 35-42.
7. Holgate ST, Bodey KS, Janezic A, Frew AJ, Kaplan AP, Teran LM. Release of RANTES, MIP-1 alpha, and MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge. *Am J Resp Crit Care Med* 1997; 156: 1377-83.
8. Rojas-Ramos E, Avalos AF, Pérez-Fernández L, Cuevas-Schacht F, Valencia-Maqueda E, Terán LM. Role of the chemokines RANTES, monocyte chemotactic proteins -3 and -4, and eotaxins -1 and -2 in childhood asthma. *Eur Resp J* 2003; 22: 310-16.
9. Ying S, Meng Q, Zeibecoglou K, et al. Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, MCP-3 and MCP-4, and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic asthmatics. *J Immunol* 1999; 163: 6321-99
10. Elias JA, Zhu Z, Chupp G, et al. Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest* 1999; 104:1001–1006
11. Barnes PJ, Adcock IM. Transcription factors and asthma. *Eur Resp J* 1998; 12: 221
12. Kodama T, Shimizu N, Yoshikawa N, Makino Y, Ouchida R, Okamoto K, et al. Role of the glucocorticoid receptor for regulation of hypoxia-dependent gene expression. *J Biol Chem* 2003; 278(35): 33384-91.
13. Zagorzcka A, Dulak J. HIF-1, the knows and unknowns about hypoxia sensing. *Act Biochim Pol.* 2004; 51(3): 563-585.
14. Ratcliffe PJ. HIF-1 and HIF-2: working together or alone in hypoxia? *J Clin Invest.* 2007; 117(4): 862–865.

15. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, et al. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 1996; 271:C1172–C1180
16. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: oxygen sensing protein hydrolases, hypoxia-inducible transcription factors, and oxygen-regulated gene expression. *FASEB J* 2002; 16: 1151-62.
17. Yu AY, Frid MG, Shimoda LA, Wiener CM, Stenmark K, Semenza GL. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1998; 275: L818-L826.
18. Fajardo I, Svensson L, Bucht A, Pejler G. Increased levels of hypoxia-sensitive proteins in allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170(5):477-484.
19. Barbakadze TR, Garakanidze IG, Mamuchishvili IG, Tatulashvili DR. State of the endothelial system and expression of tissue hypoxia in children with bronchial asthma of atopic geneses. *Georgian Med News* 2005;(123):40-42.
20. Ferrante E, Quatela MM, Pistelli R, Fuso L. Hypoxemia in young asthmatics with mild airway obstruction by methacholine challenge. *Mil Med* 1999; 164(11):820-823.
21. Cydulka RK. Acute asthma during pregnancy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006; 26(1):103-117.
22. Saito H, Nishimura M, Shinano H, Sato F, Miyamoto K, Kawakami Y. Effect of mild hypoxia on airway responsiveness to methacholine in subjects with airway hyperresponsiveness. *Chest* 1999; 116(6):1653-1658.
23. Bass JL, Corwin M, Gozal D, Moore C, Nishida H, Parker S et al. The effect of chronic or intermittent hypoxia on cognition in childhood: a review of the evidence. *Pediatrics* 2004; 114(3):805-816.
24. Eckert DJ, Catcheside PG, Smith JH, Frith PA, McEvoy RD. Hypoxia suppresses symptom perception in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169(11):1224-1230.
25. Madjpour C, Jewell UR, Kneller S, Ziegler U, Schwendener R, Booy C et al. Decreased alveolar oxygen induces lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 284: L360-L367.
26. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004; 10(8): 858-864.

27. Sun Lee K, Ri Kim S, et al. Peroxisomal proliferator activated receptor gamma modulates reactive oxygen species generation and activation of nuclear factor-KB and hypoxia-inducible factor 1 alpha in allergic airway disease of mice. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 120-7.
28. Lee SY, Kwon S, Kim KH, Moon HS, Song JS, Park SH, Kim YK. Expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor in the airway of asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006 Dec;97(6):794-9.
29. NHLBI guidelines for the diagnosis and management of asthma. National Heart, Lung and Blood Institute. *Lippincott Health Promot Lett* 2002; 2(7):1, 8-1, 9.
30. Li AM, Tsang TWT, Chan DFY, Sung RYT, Fok TF. Induced sputum in childhood asthma. *Hong Kong Med J* 2005; 11: 289-94.
31. Taha RA, Laberge S, Hamid Q, Olivenstein R. Increased expression of the chemoattractant cytokines Eotaxin, Monocyte Chemotactic Protein -4 and Interleukin -16 in Induced sputum in asthmatic patients. *Chest* 2001; 120: 595-601.
32. Covar RA, Spahn JD, Martin RJ, Silkoff PE, Sundstrom DA, Murphy J, Szefer SJ. Safety and application of induced sputum analysis in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 575-82.
33. Hunter CJ, Ward R, Woltmann G, Wardlaw AJ, Pavord ID. The safety and success rate of sputum induction using a low output ultrasonic nebuliser : Special Issue Featuring Chronic Bronchitis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Finnish National Guidelines for Prevention and Treatment. *Respir Med* 1999; (93)5: 345-48.
34. Vignola AM, Rennar SI, Hargreave FE, et al. Standardised methodology of sputum induction and processing: future directions. *Eur Respir J Suppl* 2002; 37:51s-55s.
35. Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., & Buchner, A. (2007). G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, 39, 175-191.
36. O'Lonergan TA, Milgrom H. Ethical considerations in research involving children. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005; 5(6):451-458.