



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
“Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”
SERVICIO DE ALERGOLOGÍA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA

**“RELACIÓN DE LOS NIVELES DE QUIMIOCINAS Y
CITOCINAS EN PACIENTES ADULTOS ASMÁTICOS
CON DIFERENTES NIVELES DE GRAVEDAD, EN
OBESOS Y NO OBESOS.”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE SUBESPECIALIDAD EN
ALERGOLOGÍA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA**

Tesista: Miyagui Namikawa Jesús Roberto Ken

Asesor: Dra. Rojas Dotor Sarah

**Co-Asesores: Dra. Segura Méndez Nora Hilda
Dr. Mondragón González Rafael**

México D. F.

Febrero 2010



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.

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
"Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez"
SERVICIO DE ALERGOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

**"RELACIÓN DE LOS NIVELES DE QUIMIOCINAS Y
CITOCINAS EN PACIENTES ADULTOS ASMÁTICOS
CON DIFERENTES NIVELES DE GRAVEDAD, EN
OBESOS Y NO OBESOS."**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE SUBESPECIALIDAD EN
ALERGOLOGÍA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA**

Tesista: Miyagui Namikawa Jesús Roberto Ken*

Asesor: Dra. Rojas Dotor Sarah***

Co-Asesores: Dra. Segura Méndez Nora Hilda**

Dr. Mondragón González Rafael****

** Residente de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda" Centro Médico Nacional Siglo XXI.*

*** Médico Adscrito del Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda" Centro Médico Nacional Siglo XXI.*

**** Unidad de Investigación Médica en Inmunología Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI.*

Instituto Mexicano del Seguro Social. México, DF.

***** Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda" Centro Médico Nacional Siglo XXI.*

**“RELACIÓN DE LOS NIVELES DE QUIMIOCINAS Y
CITOCINAS EN PACIENTES ADULTOS ASMÁTICOS
CON DIFERENTES NIVELES DE GRAVEDAD, EN
OBESOS Y NO OBESOS.”**

FOLIO:

F-2009-3601-32

REGISTRO:

R-2009-3601-47

Asesor de Tesis:

Dra. Rojas Dotor Sarah

*Unidad de Investigación de Inmunología Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo
XXI.*

Instituto Mexicano del Seguro Social. México, DF.

Co-asesores:

Dra. Segura Méndez Nora Hilda

*Médico de Base del Servicio de Alergología e
Inmunología del Hospital de Especialidades
“Dr. Bernardo Sepúlveda” Centro Médico
Nacional Siglo XXI.*

Dr. Mondragón González Rafael

*Unidad de Epidemiología Clínica del
Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo
Sepúlveda” Centro Médico Nacional
Siglo XXI.*

Dra. Menez Díaz Diana

*Jefe del departamento de Investigación y Educación en Salud.
Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez"
Centro Médico Nacional Siglo XXI.
Instituto Mexicano del Seguro Social. México, DF.*

Dr. Almeida Arvizu Victor Manuel

*Jefe del Servicio de Alergología e Inmunología Clínica
Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez"
Centro Médico Nacional Siglo XXI.
Instituto Mexicano del Seguro Social. México, DF.*

DEDICATORIA

A DIOS:

Porque sin él no soy nada, siempre me acompaña, y me ilumina en tiempos difíciles y festejamos juntos en tiempos felices.

A MIS PADRES:

Porque no solo fueron mis primeros maestros, sino un ejemplo a seguir del esfuerzo, dedicación y perseverancia, pilares en mi carrera que sin ellos no estuviese donde estoy. Gracias por apoyarme en las buenas y en las malas. Dios me bendijo con los mejores padres del mundo. Gracias padres hermosos... los quiero mucho.

A MIS HERMANAS, CUÑADOS Y SOBRINOS:

Por su amor y apoyo incondicional, por inspirarme y ayudarme a ser profesional y mejor persona, que a su vez, serviré de inspiración a mis bellos sobrinos... los quiero mucho.

A JADE:

Por su amor, y porque en tan poco tiempo me ha inspirado a ser una mejor persona de manera física, mental y sentimental... Te amo.

A G R A D E C I M I E N T O S

A la Dra. Nora Hilda Segura:

Gracias doctora, porque nunca había tenido un profesor adjunto como usted, que se preocupara tanto por nosotros, no solo en cuestión académica, sino personal. Gracias por apoyarnos en todo momento... aún cuando nadie más lo hiciera o creyera en nosotros.

A mi asesor Dra. Sarah Rojas y co- asesor Dr. Rafael Mondragón:

Gracias a ambos, porque sin conocerme me dieron la oportunidad de trabajar con ustedes, y en varias ocasiones con mucha paciencia me explicaron el como, cuando, donde y porqué de éste trabajo.

A mis compañeros y amigos de la residencia:

Gracias porque sin ustedes mi residencia hubiese sido aburrida y no hubiera aprendido tantas cosas, no solo académicas sino de mi persona. Realmente hicimos un buen equipo, aprendimos a tolerarnos... y lo mejor de todo es que nos hicimos amigos.

Í N D I C E

RESÚMEN	9
INTRODUCCIÓN	11
Obesidad y Asma	11
Asma	11
Obesidad	12
Inflamación	13
Quimiocinas	14
Citocinas	20
Resistina	22
Ácaros	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
JUSTIFICACIÓN	23
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVO PARTICULAR	25
MATERIAL Y MÉTODOS	26
RESULTADOS	38
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	50
REFERENCIAS	51
ANEXOS	53

R E S Ú M E N

RELACIÓN DE LOS NIVELES DE QUIMIOCINAS Y CITOCINAS EN PACIENTES ADULTOS ASMÁTICOS CON DIFERENTES NIVELES DE SEVERIDAD, EN OBESOS Y NO OBESOS.

Introducción: La obesidad y el asma son problemas de salud pública en nuestro país. El asma tiene una prevalencia en México de 9.5%, y la obesidad es de 23.7%. La obesidad incrementa el riesgo de padecer asma en niños y adultos, su severidad, proceso inflamatorio bronquial, produce compresión mecánica lo que conlleva a la disminución en la capacidad pulmonar con un patrón restrictivo. Las quimiocinas y sus receptores ayudan al control de selección selectiva y activación de células inflamatorias. El tejido adiposo secreta quimiocinas y adipocinas pro-inflamatorias como: Proteína Inflamatoria derivada de Macrófago 1alfa (MIP-1 alfa), Proteína Interferón Inducible-10 (IP-10), Proteína Quimioatrayente Monocítica-3 (MCP-3), Resistina, IL-6 y Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF-alfa).

Objetivo: Identificar *in vitro* la expresión de algunas quimiocinas y la producción de citocinas en células polimorfonucleares en los diferentes niveles de gravedad del asma en pacientes obesos y no obesos.

Material y métodos: El mismo médico alergólogo realizó el diagnóstico de asma alérgica mediante una detallada historia clínica, espirometría con reversibilidad y pruebas cutáneas, el día que acudió a la cita. Se midieron y pesaron los pacientes, posteriormente clasificándolos según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en obesos y peso normal.

Previo consentimiento informado se tomaron 15 ml de sangre periférica a los individuos sanos y en pacientes con diagnóstico de asma alérgica en obesos y no obesos con diferentes niveles de gravedad según las guías de GINA 2008: Intermitente (I), Leve Persistente (LP), Moderada Persistente (MP) y Grave Persistente (GP), para comparar los niveles de quimiocinas y sus ligandos. De la muestra de sangre se aislaron células mononucleares por el método de Böyum. Se cultivaron por 24 horas y las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales anti- CXCR3/IP-10, CCR5/MIP-1 α , CCR4 y se identificó por citometría de flujo el porcentaje de células que expresaron estas moléculas. La producción de citocinas IL-6, IL-10 y resistina fue determinado en los sobrenadantes de incubación por el método de ELISA.

Resultados: En pacientes obesos con asma GP se encontró un aumento ($p < 0.05$) de MIP-1- α con respecto al control y en los asmáticos obesos independientemente de su nivel de gravedad mostraron una sobre-expresión de 10 veces mayor con comparada con los no obesos, CXCR3/IP-10 se sobre-expresó en asmáticos obesos I y GP (50%) mientras que en el grupo de asmáticos GP sin obesidad ésta elevación fue del 4%. La expresión de CCR4 fue baja en todos los grupos estudiados. La producción de IL-6 aumentó en pacientes obesos y no obesos con asma MP y disminuyó en I y LP. La resistina se sobre-expresó en pacientes asma y obesidad. La IL-10 se encontró elevada, en pacientes con asma GP ($p < 0.05$).

Conclusiones: CXCR3/IP-10, CCR5/MIP1- α podrían ser consideradas como Inmuno-marcadores de inflamación en pacientes asmáticos obesos. Hay asociación entre obesidad, inflamación y gravedad del asma en concordancia con las concentraciones de IL-6, y resistina, aumentadas en pacientes obesos. IL-10 se incremento en todos los grupos de pacientes regulando la respuesta anti-inflamatoria.

INTRODUCCIÓN

Obesidad y Asma

La obesidad y el asma son problemas de salud pública en nuestro país. El asma tiene una prevalencia de 9.5%, en el año 2000 ocupó el 10º lugar de las enfermedades reportadas por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), por otra parte la prevalencia de obesidad en México es de 23.7%, lo que significa que 25 millones de mexicanos son obesos.¹⁻³

Asma

El asma es un trastorno inflamatorio crónico de las vías aéreas, clínicamente se caracteriza por obstrucción en el flujo de aire y síntomas respiratorios; sibilancias, dificultad respiratoria, opresión torácica y tos, especialmente nocturna o durante la madrugada, los síntomas son reversibles, espontáneamente o con tratamiento.⁴

En el mundo, se calcula que existen aproximadamente 300 millones de asmáticos, con una prevalencia del 1 - 18%, constituye un problema de salud pública a nivel mundial. En Estados Unidos, se ha calculado que existen alrededor de 22 millones de asmáticos y genera más de 4,000 muertes al año.⁴

En México, el asma tiene una prevalencia promedio del 9.5% a nivel nacional en el año 2000, la incidencia de hospitalizaciones ha disminuido en el 0.6% y las visitas al médico en el 18% de 1991 al 2001, sin embargo, su mortalidad,

se encuentra entre las más altas de América Latina, con una tasa de 5.63 por cada 100,000 habitantes.^{5,6}

Obesidad

La obesidad es considerada al igual que el asma, como una enfermedad crónica, que induce inflamación, pero la primera lo hace de manera sistémica.⁷

En Estados Unidos el 65% de los adultos mayores de 20 años presenta sobrepeso u obesidad con un incremento en su prevalencia del 10% de 1988 a 1994.⁸ En nuestro país la prevalencia de obesidad es de 23.7%.¹

El tejido adiposo secreta quimiocinas y adipocinas proinflamatorias, tales como: MIP-1alfa (□Proteína Inflamatoria derivada de Macrófago-1 alfa), □IP-10 (Proteína Interferón Inducible-10), MCP3 (Proteína 1 Quimioatrayente Monocítica), resistina, IL-6 (Interleucina-6) y TNF-alfa (Factor de Necrosis Tumoral-alfa), y se encuentran asociados a marcadores sistémicos de la inflamación como la proteína C reactiva e IL-6.⁷

Diversos estudios han mostrado que la obesidad incrementa el riesgo de padecer asma en niños y adultos, además de incrementar su severidad, particularmente en mujeres. Además de incrementar el proceso inflamatorio bronquial, la obesidad induce compresión mecánica con disminución de la capacidad pulmonar y alteraciones de la mecánica ventilatoria con patrón restrictivo.^{9,10}

Ambas enfermedades, la obesidad y el asma son crónicas y la inflamación es el punto de convergencia de ambas enfermedades.

Inflamación

La inflamación es un evento complejo, en respuesta a un daño externo o un estímulo interno, inducido por agentes químicos tóxicos, factores físicos, microorganismos y sus metabolitos.^{11,12}

El infiltrado inflamatorio en el asma es multicelular y está formado por eosinófilos, neutrófilos, linfocitos y células mononucleares en proporción variable. Estas células y los mediadores que se liberan en el proceso de activación son la causa de las respuestas agudas y crónicas que se producen en el asma. La respuesta inflamatoria aguda ocurre a los pocos minutos, tras el contacto y la unión del alérgeno con la IgE específica fijada a los receptores de superficie de la célula cebada, y da lugar a la liberación de mediadores biológicamente activos, que originan un incremento en la permeabilidad vascular y la extravasación de fluido hacia los tejidos. La respuesta crónica, cuando se produce, ocurre entre 4 y 12 horas después y es consecuencia de la activación de las células T y de la acumulación de eosinófilos y basófilos.¹³

La respuesta inflamatoria es regulada por citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, particularmente Interleucinas 6 (IL-6) y 1 (IL-1) que estimulan la liberación y síntesis de reactantes de la fase aguda.^{11,12}

TNF-alfa, Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF-beta), e IL-4 e IL-8 regula la síntesis de proteínas de la fase aguda.¹¹

El Factor Nuclear de Transcripción- kappa B (NFκB) es fundamental en la respuesta inflamatoria. Varios factores estimuladores, incluyendo IL-1 y TNF-alfa, favorecen la liberación de NFκB el cual desde el núcleo donde activa los genes para la síntesis de IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alfa, molécula de adhesión intracelular, y molécula de adhesión celular vascular. NFκB también es autorregulada, y el estrés oxidativo puede activarla.¹¹

Quimiocinas

Las quimiocinas, son un grupo de pequeñas moléculas (8 a 12 kDa), que inducen la quimiotaxis de leucocitos circulantes a los sitios de inflamación o lesión, activan la producción y secreción de mediadores inflamatorios. Se ha demostrado que múltiples quimiocinas se pueden unir a un solo receptor, así como diferentes receptores a una quimiocina.^{7,14}

Las quimiocinas participan además en el reclutamiento de células inflamatorias hacia las vías aéreas inferiores, y son liberadas principalmente por células epiteliales de las vías aéreas superiores e inferiores.¹⁵

Existen 4 familias de quimiocinas de acuerdo a la localización de sus residuos cisteína amino-terminal, llamadas C, CC, CXC y CX3C.¹⁵

La mayor parte de las quimiocinas pertenecen a las clases CC o CXC, y las 2 cisteínas N-terminales se encuentran adyacentes o tienen un único amino ácido que los separa respectivamente. Las quimiocinas clase C, muestran una cisteína amino-terminal separada de 3 residuos.¹⁵

La nomenclatura de las quimiocinas incluye L (ligando) posterior a la clase de quimiocina, ejemplo, en caso de la clase CC su ligando es CCL, otros ejemplos son CXCL (CXC ligando), CX3CL (CX3C ligando), y XCL (XC ligando), agregándoles un número que los identifica.¹⁵ Existe algunas excepciones de ligandos que no se les agrega la terminación L, por ejemplo MIP 1 alfa, IP-10. Todas las quimiocinas tienen su receptor y se agrega R posterior a la clase, ejemplo, para la clase CC su receptor es CCR, seguido por el número que los identifica, ejemplo, CCR5. De ésta manera, es común que al referirse a un receptor de quimiocina al mismo tiempo hagamos referencia a su ligando, y se coloquen en pares, por ejemplo CCR5 con su ligando MIP 1alfa, □□CCR5/ MIP□1 alfa□.

Las quimiocinas ejercen sus funciones biológicas a través de los receptores de quimiocinas, las cuales pertenecen a la superfamilia de receptores acoplado a proteína G (GPCR), que forma parte del casi 5% de las regiones codificadas del genoma humano. Los leucocitos expresan diferentes receptores de quimiocinas de forma simultánea y pueden ser divididos en 2 grupos: los constitutivamente expresados por leucocitos y aquellos inducidos bajo condiciones inflamatorias.¹⁵

El reclutamiento de células dendríticas inmaduras hacia los tejidos inflamados es mediado por receptores, como CCR2, **CCR5** y CXCR4, estos receptores son selectivos, de acuerdo a su origen celular. Las células T pueden regular la expresión en su superficie celular de diferentes receptores de quimiocinas, lo que les permite responder a una gran variedad de señales.¹⁵

Las células T_{H1} productoras de IL-2, Interferón-gamma (IFN-gamma) y $\square\square$ TNF-beta \square expresan **CCR5 y CXCR3**, que son atraídas por sus ligandos específicos CCL5 (CCR1, 3, **5**), CCL3 (CCR1, **5**), CCL4 (**CCR5**) y CXCL10 (**CXCR3**), CXCL9 (**CXCR3**) y CXCL11 (**CXCR3**).¹⁵⁻¹⁷

Las células T_{H2} producen IL-4, IL-5, IL-13 y expresan CCR3, **CCR4** y CCR8, que son atraídos por sus ligandos específicos CCL11 (CCR3), CCL17 (**CCR4**), CCL22 (**CCR4**) y CCL1 (CCR8).¹⁵⁻¹⁷

Eotaxina es relativamente selectiva para eosinófilos, mientras que las Quimiocinas Reguladas por Activación del Timo (TARC) y Quimiocinas Derivadas de Macrófagos (MDC) reclutan linfocitos T helper 2 (T_{H2}).⁴

Varias quimiocinas CC han sido sobre-reguladas en el tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos en comparación con los delgados. CCR1, CCR2 y **CCR5** son expresados en cultivos de adipocitos humanos y están presentes en la superficie celular de los adipocitos en el tejido adiposo subcutáneo.⁷

Las concentraciones en suero de IL-6 y proteína C reactiva, son significativamente elevadas en pacientes obesos al compararlos con sujetos delgados, pero no se observaron cambios al evaluar las concentraciones de TNF-alfa.⁷

El incremento en peso, aumenta los niveles de leptina y IL-6 y disminuye la actividad de los linfocitos T reguladores, este mecanismo podría explicar en parte la predisposición de los pacientes obesos para presentar atopia, es decir, enfermedades alérgicas.¹⁰

Concentraciones en suero de CCL5 y RANTES, pero no de CCL2 (Proteína 1 Quimioatrayente Monocítica o MCP-1) y CCL3 (MIP-1 alfa), se encuentran significativamente altas en obesos en comparación a delgados.⁷

La expresión genética de las quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5, CCL7 (MCP-3), CCL8 y CCL11, están incrementadas en el tejido adiposo subcutáneo y en el tejido adiposo blanco visceral de pacientes obesos comparados con los delgados.⁷

También, la expresión genética de los receptores de quimiocinas CCR1, CCR2, CCR3 y **CCR5**, se encuentra significativamente elevados en tejido adiposo subcutáneo y tejido adiposo blanco visceral de pacientes obesos comparado a los delgados.⁷

Además, la expresión de CCR2 y **CCR5** en tejido adiposo blanco visceral es mayor que en la subcutánea.⁷

Algunos estudios han mostrado elevación de MCP-1 en suero (sMCP-1) de pacientes obesos, pero niveles normales de MCP-1 intersticial (iMCP-1) al compararlos con sujetos delgados. Estos hallazgos sugieren que en los pacientes obesos con sobre-expresión del gen de tejido adiposo abdominal subcutáneo, el MCP-1 es un biomarcador de la inflamación de este tejido, y puede reflejar afección al metabolismo de la glucosa.¹⁸

El patrón característico de la inflamación en el asma, incluye la activación de células cebadas, incremento en el número de eosinófilos activados y de receptores de células T activados, células T asesinos naturales (NK) y linfocitos T_{H2}, que inducen la liberación de mediadores que contribuyen a la presencia de los síntomas clínicos.⁴

Se han identificado en el lavado broncoalveolar de pacientes con asma severa citocinas y quimiocinas como: IL-1Ra, **MIP-1 alfa**, MIG, IL-15, IL-2R, **IP-10**, IL-4, **IL-6**, MCP-1 e IL-2.¹⁹

Sin embargo existe escasa información sobre las concentraciones de estas citocinas y quimiocinas en el suero de pacientes con diferentes niveles de gravedad del asma que presentan o no obesidad.

Existen incrementos significativos en las concentraciones de CCL17, en esputo y suero de pacientes asmáticos, en comparación con controles sanos.¹⁶

Lo que puede sugerir que algunas quimiocinas presentan concentraciones similares tanto esputo como en suero.

La Proteína Quimiotáctica de Monocito 1 (MCP-1/CCL2), IL-6, IL-8 (CXCL8) participan de forma importante en la infiltración de varias células hacia los tejidos.

CXCL10 o \square **IP-10**, ligando del receptor de quimiocina de **CXCR3**, parece estar sobrerregulada en el pulmón alérgico posterior a prueba de provocación con alérgeno y los ligandos de **CXCR3** son antagonistas naturales de respuestas mediadas por CCR3.¹⁵

Las células T reguladoras (Treg) podrían suprimir la inflamación alérgica. Los linfocitos Treg CD4+ han mostrado expresar CCR3, **CCR4**, **CCR5**, **CXCR3** y CCR8.¹⁵

Los linfocitos NK son reguladores importantes de la respuesta inmune innata y pertenecen a la subpoblación de las células T alfa beta. La mayoría de las células NK expresan CCR1, CCR2, **CCR5**, **CXCR3**, CXCR4, y CXCR6, mientras que la expresión de CCR7 es significativamente menor que otras subpoblaciones de células T.¹⁵

Los basófilos humanos expresan receptores de quimiocinas, Likura y colaboradores detectaron transcripciones de RNAm para CCR1, CCR2, CCR3 y **CCR5**.⁴ Los basófilos humanos se activan y degranulan en respuesta a CCL2 y otras quimiocinas, como CCL3, CCL5, CCL7 y CCL8.²⁰

Células cebadas expresan c-kit, y el ligando para su receptor se han identificado al menos 9 receptores de quimiocinas, incluyendo CXCR1, CXCR2, **CXCR3**, CXCR4, CX3CR1, CCR1, CCR3, **CCR4**, **CCR5**, y sus ligandos han mostrado ser quimiotácticas para éstas células.^{15,20}

La eosinofilia en sangre y en tejidos son características de la inflamación y el asma alérgica, algunas quimiocinas clase CC son quimioatrayentes de eosinófilos, incluyendo células T Normales Expresadas y Secretadas Reguladas en Activación (RANTES, también conocida como CCL5) y **MIP 1 alfa** (CCL3).²¹

La producción excesiva de quimiocinas se ha relacionado con la patogénesis de asma, y se están realizando diversos trabajos dirigidos a comprender su funcionamiento y proveer una terapéutica capaz de antagonizar el receptor de la quimiocina.¹⁵

Citocinas

Otros mediadores importantes en la respuesta inflamatoria tanto en el asma como la obesidad son las citocinas. Son glucoproteínas solubles, de 15 a 30 kDa, formadas por 120-180 aminoácidos, producidas por leucocitos, pero pueden ser secretadas por otros muchos tipos celulares. Constituyen señales de comunicación entre distintos tipos de leucocitos, se incluyen en este rubro interleucinas, factores de crecimiento de colonias, interferones y quimiocinas.²²

El perfil de citocinas de pacientes con asma no atópica suele ser similar al procedente de asmáticos alérgicos, y ambas cursan con un predominio de IL-4, IL-5 e IL-13 sin elevación del IFN-gamma, en contraste con el perfil de citocinas de sujetos sanos no asmáticos.¹³

Existen citocinas proinflamatorias, en la cuales se encuentran: IL-1, TNF, **IL-6**, Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos- Granulocitos (FSC-GM) y Factor Estimulador de Colonias Granulocitos (FSC-G).²³

La **IL-6** es secretada por varios tipos celulares, entre los que se encuentran las células del sistema inmune, fibroblastos, células endoteliales, músculo esquelético y por supuesto el tejido adiposo. Puede actuar a estos niveles, tanto de forma paracrina y autocrina en el tejido adiposo, como de manera endocrina, en los tejidos periféricos, alterando el peso corporal, la homeostasis energética y la sensibilidad a la insulina.²⁴

IL-10 es un producto de numerosas células, incluyendo linfocitos T_{H2}, células T citotóxicas, linfocitos B, células cebadas, células dendríticas y la principal fuente son los linfocitos T reguladores. IL-10 inhibe la producción de IFN-gamma e IL-2 de los linfocitos T_{H1}; IL-4 e IL-5 de los linfocitos T_{H2}; TNF-alfa de los fagocitos mononucleares; e IFN-gamma y TNF-alfa por las células NK.²⁵

Resistina

Uno de los principales efectos de las adipocinas es la homeostasis metabólica ya sea sensibilizando o desensibilizando la acción de la insulina en los diferentes tejidos blanco, lo que se conoce como resistencia a la insulina.

Resistina es una proteína secretada en el tejido adiposo blanco, pertenece a una familia de proteínas de secreción ricas en cisteína. El RNAm de la resistina codifica para un polipéptido de 114 aminoácidos, con 20 de ellos como péptido señal y que es secretado en forma de dímero.²⁴

Tiene una potente acción proinflamatoria a través de la activación vía NFκB. La resistina activa los macrófagos, liberando citocinas proinflamatorias (TNF-alfa, IL-12), con una potencia igual o mayor a las endotoxinas.⁹

Ácaros

Los ácaros constituyen la causa más común de asma alérgico y el principal alérgeno intradomiciliario. Aproximadamente el 94% de los pacientes con asma severo están sensibilizados a ácaros.²⁶

El extracto de un ácaro como *Dermatophagoides pteronyssinus* (DpE) incrementa la expresión de MCP-1, **IL-6** e IL-8 y traduce su señalización a través de la vía familia Src tirosin cinasa, protein cinasa C delta (PKC delta), señal Cinasa Reguladora Extracelular (ERK) en una manera independiente a la proteasa.²⁷

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Éste trabajo pretende estudiar la relación de las quimiocinas y citocinas en pacientes asmáticos con diferentes niveles de gravedad de su enfermedad que presentan además obesidad.

Los resultados de este trabajo nos permitirán conocer mejor la participación de las quimiocinas en los mecanismos fisiopatológicos presentes en los pacientes asmáticos obesos. Es posible que las quimiocinas evaluadas en este trabajo puedan ser utilizadas en el futuro como marcadores biológicos de gravedad y/o remodelación en los pacientes asmáticos obesos.

JUSTIFICACIÓN

La obesidad y el asma están asociadas con un estado de inflamación crónico, el tejido adiposo en sujetos obesos presenta infiltración de macrófagos y mayor producción de mediadores de la inflamación.

El asma es una enfermedad de tipo inflamatorio de las vías aéreas caracterizada por presentar entre otros signos clínicos un alto grado de inflamación. La respuesta inflamatoria es principalmente regulada por receptores de quimiocinas, quimiocinas y citocinas. Las quimiocinas se caracterizan por su actividad quimiotáctica altamente selectiva y por la activación de diferentes tipos celulares para producir citocinas e incrementar la respuesta inflamatoria y/o eliminar patógenos. La producción diferencial de varias quimiocinas y de sus receptores es de gran importancia en la inmunidad y patología del asma, además, recientemente se ha reportado que la obesidad y el asma están asociadas con un estado de inflamación crónico, el tejido adiposo en sujetos obesos presenta infiltración de leucocitos y mayor producción de mediadores de la inflamación. Las quimiocinas son cruciales para la atracción de células mononucleares de la circulación al tejido bronquial y es regulado por la acción de citocinas, por lo que es importante conocer su expresión en los diferentes grados de severidad del asma y estar en condiciones de poder proponer una terapéutica más apropiada en cada grado de severidad y conocer su relación en pacientes obesos en comparación con los no obesos.

OBJETIVO GENERAL

Conocer los patrones de expresión in vitro de receptores de quimiocinas y sus ligandos y la producción de las principales adipocinas en sangre periférica de adultos sanos, obesos no asmáticos y pacientes con diferentes niveles de gravedad de asma, obesos y no obesos.

OBJETIVO PARTICULAR

- 1) Establecer el diagnóstico de asma en pacientes captados en Hospital de Especialidades y clasificarlos según su nivel de gravedad (Intermitente, Leve Persistente, Moderada Persistente, Grave Persistente).

- 2) Establecer el diagnóstico de de obesidad según la Organización Mundial de la Salud.
- 3) Determinar la relación en la expresión de receptores de quimiocinas y sus ligandos (MIP1 α /CCR5, CXCR3/IP-10, CD3/CCR4) en los diferentes niveles de gravedad del asma según las guías de GINA 2008.
- 4) Determinar la producción de citocinas – adipocinas (IL-6, IL-10, Resistina) en sobrenadantes de los cultivos celulares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de Estudio

Estudio Transversal y Comparativo

Lugar de Estudio:

- Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepulveda”, Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS, México, Distrito Federal.
- Unidad de Investigación de Inmunología en el Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS, México, Distrito Federal.

Duración y Proceso de Investigación:

4 meses a partir de la selección de pacientes

Población Objetivo

Pacientes adultos entre 18 a 65 años, con diagnóstico de asma alérgica con diferentes grados de severidad: Intermitente, Leve Persistente, Moderada Persistente, Grave Persistente.

Variable Independiente

Pacientes con asma con diferentes niveles de gravedad de acuerdo a las guías de GINA 2008.

Variables Dependientes

Receptores de Quimiocinas y sus ligandos: CCR5/MIP 1 alfa, CXCR3/IP-10, CCR4

Citocinas: IL-6, IL-10

Resistina

Definición Operativa de las Variables

Diagnóstico de Asma Alérgica

Se utilizaron los criterios diagnósticos de asma alérgico de acuerdo a las guías internacionales GINA 2008, que incluye síntomas clínicos, espirometría y pruebas cutáneas.

Clasificación por Niveles de Gravedad del asma según las Guías de GINA 2008

Fueron clasificados los pacientes asmáticos de acuerdo con la presencia de síntomas, limitación de la vía aérea, y variabilidad de la función pulmonar en 4 categorías: Intermiteinte, Leve Persistente, Moderada Persistente, o Grave Persistente.⁴

Asma Intermiteinte: Síntomas menos de 1 vez por semana, exacerbaciones leves, síntomas nocturnos menores a 2 veces por mes, Volumen máximo espirado en el primer segundo de una espiración forzada (FEV1) o Flujo Espiratorio Pico (PEF) mayor o igual a 80% del predicho, con variabilidad menor de 20%.

Leve Persistente: Síntomas más de 1 vez por semana pero menos de 1 vez al día, exacerbaciones pueden afectar la actividad y para dormir, síntomas nocturnos mayores a 2 veces por mes, FEV1 o PEF mayor o igual a 80% del predicho, con variabilidad menor de 20-30%.

Moderada Persistente: Síntomas diarios, exacerbaciones pueden afectar la actividad y para dormir, síntomas nocturnos mayores a 1 vez a la semana, uso diario de B2-agonistas de corta duración, FEV1 o PEF 60 - 80% del predicho, con variabilidad mayor de 30%.

Grave Persistente: Síntomas diarios, exacerbaciones frecuentes, síntomas nocturnos frecuentes, uso diario de B2-agonistas de corta duración, FEV1 o PEF igual o menor de 60% del predicho, con variabilidad mayor de 30%.⁴

Quimiocinas son un grupo de moléculas, que inducen la quimiotaxis de leucocitos circulantes a los sitios de inflamación o lesión, activan la producción y secreción de mediadores inflamatorios. CXCR3 se ha encontrado sobre regulada en pulmón alérgico. CCR4 se ha asociado a remodelamiento de las vías respiratorias inferiores en asmáticos. CCR5 se ha encontrado sobre regulada en tejido adiposo en obesos, y su ligando MIP 1 alfa se ha identificado en lavado broncoalveolar de pacientes con asma grave.

Citocinas son glucoproteínas producidas por leucocitos principalmente. Constituyen señales de comunicación entre distintos tipos de leucocitos, se incluyen en este rubro interleucinas, factores de crecimiento de colonias, interferones y quimiocinas. IL-6 y Resistina son proteínas secretadas en el tejido adiposo blanco y tienen una potente acción proinflamatoria. IL-10 tiene efecto anti-inflamatorio, inhiben la producción de IFN-gamma e IL-2 de los linfocitos T_H1; IL-4 e IL-5 de los linfocitos T_H2.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de Inclusión

- Pacientes con diagnóstico de asma alérgica (GINA 2008)
- Edad entre 18 a 65 años en ambos géneros
- Residentes en la zona metropolitana sur de la ciudad de México
- Obesos y No Obesos
- Firmen carta de consentimiento informado para ingresar al estudio

Criterios de Exclusión

- Residencia menor a un año en la ciudad de México.
- Antecedente de inmunoterapia en el último año.
- Antecedentes personales de inmunodeficiencias
- Antecedentes personales de enfermedad autoinmune
- Antecedentes de tabaquismo y/o haber cocinado con leña
- Pacientes con diagnóstico pulmonar diferente a asma alérgica
- Embarazo confirmado
- Que hayan utilizado terapia antihistamínicos tópicos o sistémicos 2 semanas previas al ingreso al estudio.
- Que hayan recibido astemizol los 2 últimos meses previos a la realización de la prueba de prick.
- Presencia de urticaria o dermatografismo.
- Presencia de síntomas de crisis de asma en cualquiera de sus estadios

Criterios de Eliminación:

- ❖ Que no acepten practicarse la toma de sangre.

Procedimientos

- 1) El mismo médico alergólogo realizó el diagnóstico de asma alérgica mediante una detallada historia clínica, espirometría con reversibilidad y pruebas cutáneas, el día que acudió a la cita.
- 2) Se midieron y se pesaron los pacientes, posteriormente clasificándolos según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en obesos y peso normal.
- 3) Se obtuvieron muestras de sangre periférica de individuos sanos, obesos no asmáticos y en pacientes con diagnóstico de asma en obesos y no obesos con diferentes niveles de gravedad según las guías de GINA 2008 (Intermitente, Leve Persistente, Moderada Persistente y Grave Persistente), para comparar los niveles de quimiocinas y sus ligandos.
- 4) Se realizaron cultivos celulares (10^6 células por mL) de los individuos sanos, obesos no asmáticos y de los pacientes. Se obtuvo el botón celular y los sobrenadantes, se alicuotaron en un coctel crioprotector y almacenaron a -70°C hasta su uso.
- 5) Se analizaron las células y los cultivos con anticuerpos monoclonales y sus ligandos (CCR5/MIP-1alfa, CXCR3/IP-10, CCR4) por técnica de citometría de flujo.
- 6) Se determinó la producción de citocinas en los sobrenadantes de incubación por la técnica de ELISA.

Prueba de Función Respiratoria

Dentro de los estudios diagnósticos de asma, se deben de realizar pruebas de función pulmonar, ya que nos provee información adecuada sobre la gravedad, reversibilidad y variabilidad de la limitación al flujo del aire.⁴

A todos los pacientes se les realizó Espirometría, método de preferencia para medir la limitación al flujo de aire y su reversibilidad para establecer el diagnóstico del asma. Un aumento de más 12% en el FEV1 (o 200ml) luego de la administración de un broncodilatador indica reversibilidad a la limitación al flujo del aire, lo cual correlaciona con asma. (Sin embargo, muchos de los pacientes asmáticos pueden no mostrar reversibilidad en cada valoración, por lo que se recomienda efectuarlas en varias ocasiones).⁴

Se utilizó Espirometro marca EASY ONE™ Diagnostic Spirometer Manufactured for Medical Technologies.

Prueba Cutánea de Prick para Ácaros

Se realizaron pruebas de prick con reactivos estandarizados de ácaros. Las pruebas cutáneas con alérgenos representan la herramienta principal para el diagnóstico en la determinación del estado alérgico.⁴

Se requirió de:

1 kit de prick test *Dermatophagoides pteronyssinus* 3ml IPI ASAC España

1 kit de prick test *Dermatophagoides farinae* 3ml IPI ASAC España

1 kit de prick test *Glyciphagus domesticus* 3ml IPI ASAC España

1 kit de prick test *Acarus siro* 3ml IPI ASAC España

1 kit de prick test *Blomia tropicalis* 3ml IPI ASAC España

1 kit de prick test *Lepidoglyphus destructor* 3ml IPI ASAC España

1 kit de prick test *Tyrophagus putrescentiae* 3ml IPI ASAC España

2 cajas de lancetas para prick test estériles ALK-BELLO España

Se realizó la selección de pacientes basados en los criterios de selección propuestos para este estudio, se procedió a la realización de asepsia de lugar de puntura (región anterior de antebrazos, porción central, iniciando a 3 cms de articulación humero radial e igual distancia de articulación radio carpiana) con torunda de algodón inmersa en una solución de alcohol al 70%, en barridos verticales sin pasar más de una vez cada transepto definido, posteriormente se realizarán marcas lineales con plumón no permanente de forma longitudinal de 3 cms de longitud y separación entre cada línea, procederemos a aplicar una alícuota de alérgeno a investigar, después se procedió a puncionar la piel sobre la alícuota mediante lanceta para prick test, por técnica de puntura, se esperará un lapso de 15 minutos, se colocó sobre la región puncionada papel toalla suavemente para secar la zona, y se realizó una observación directa de la piel puncionada después se midió mediante regla graduada en milímetros la aparición de eritema y o roncha y anotando en hoja de resultados para cada paciente. En el caso eventual de una reacción adversa local o sistémica se realizó el procedimiento correspondiente para cada caso.

Diagnóstico de Peso Normal, Sobrepeso y Obesidad

Se midieron y se pesaron los pacientes, posteriormente clasificándolos según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los cuales han propuesto una clasificación del grado de obesidad utilizando este índice ponderal como criterio:²⁸

Normopeso: IMC (Índice de Masa Corporal) 18,5-24,9 kg/m²

Sobrepeso: IMC 25-29,9 kg/m²

Obesidad: IMC \geq 30 kg/m²

Muestras de Sangre Periférica

Las muestras de sangre periférica de pacientes con asma alérgica fueron obtenidas en el Laboratorio de Alergia e Inmunología Clínica en el Hospital de Especialidades en el Centro Médico Nacional Siglo XXI en México D. F.

Las muestras de sangre periférica de los individuos sanos y obesos no asmáticos fueron de donadas por el Banco de Sangre en el Hospital de Especialidades en el Centro Médico Nacional Siglo XXI en México D. F.

En éste estudio se trabajaron con 2 grupos experimentales:

- a) Células de individuos sanos sin estimular
- b) Células obtenidas de pacientes con asma alérgica con pruebas cutáneas positivas a ácaros, con peso normal y obesidad, además con diferentes niveles de gravedad según las guías de GINA 2008 (Intermitente, Leve Persistente, Moderada Persistente y Grave Persistente)

Obtención de Células Mononucleares en Pacientes con Asma Alérgica

Las células mononucleares se obtuvieron en condiciones de esterilidad, a partir de 30mL de sangre periférica siguiendo los métodos de Böyum. Brevemente, las muestras de sangre se diluyeron en buffer de fosfatos (PBS) 1:1 v/v y se colocaron sobre un gradiente de Ficoll. Hypaque (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) en tubos de 10mL estériles (Falcon Oxnard, CA, USA), se centrifugaron a 400 x g durante 30 minutos a 22°C, las células de interfase se recuperaron y se lavaron 2 veces con PBS. Se determinó la viabilidad por el método de exclusión con azul triptano.

Cultivo Celular

1 X 10⁶ células mononucleares obtenidas de donadores sanos y pacientes que presentaron asma intermitente, leve persistente, moderada persistente y grave persistente fueron cultivadas por 24 h y 5 X 10⁵ células sin estimular como control negativo en medio RPMI 1640 1X (Gibco BRL) suplementado con suero fetal bovino (FCS) al 10%, 100 U/ml de penicilina, 200 mM de L-glutamina, 100 U/ml de estreptomicina, 5 mg/ ml de gentamicina y piruvato de sodio al 1 %. Las células se cosecharon y se procesaron para citometría de flujo. Los sobrenadantes se centrifugaron a 1500 rpm 10 minutos y se alicuotaron 200 µl en tubos eppendorf. Se almacenaron a -70° C hasta su uso.

Tinción Inmunofluorescente para quimiocinas y receptores de quimiocinas

Después del cultivo 5 x 10⁵ células mononucleares se marcaron con anticuerpos monoclonales y anti-receptores de quimiocinas CCR5/MIP-1α,

CXCR3/IP-10, CCR4, conjugados a un fluorocromo como isotiocianato de fluoresceína o ficoeritrina (FITC o PE), como control de isotipo se utilizaron IgG1 de ratón, se incubaron 20 minutos a 4°C en oscuridad, se lavaron y se fijaron con 35µL de P-formaldehído al 1%. Se analizaron por citometría de flujo (FACs Aria Becton Dickson, San José, CA, USA).

Determinación de IL-6, IL-10 y Resistina por el Método de ELISA.

Se determinó la cantidad de niveles de proteína presentes en los sobrenadantes de los cultivos celulares para Resistina, IL-10 e IL-6 (Biosource Intl. Inc., CA, PreproTech México, S.A. de C.V., Veracruz, México) en los sobrenadantes de los cultivos celulares por el método de ELISA. Se usaron equipos comerciales, siguiendo los protocolos sugeridos por el fabricante. La sensibilidad de los ensayos fue de 16 pg/ml (resistina), 64 pg/ml (IL-10) y 32 pg/ml (IL-6). Todas las muestras fueron medidas por triplicado.

Análisis Estadístico

Los datos se analizaron con el software SPSS versión 14.0.1. (Chicago, Ill, USA). Los datos son expresados como el promedio \pm DE de tres experimentos independientes. Se realizó el análisis no paramétrico utilizando la U de Mann-Whitney. Las diferencias se considerarán significativas cuando $p < 0.05$.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

La realización de este proyecto no contraviene las disposiciones de los códigos de Helsinsky para la experimentación en seres humanos y cumple con los requisitos de ética.

Fue presentado para su evaluación y aprobado por el comité local de investigación. FOLIO: F-2009-3601-32, REGISTRO: R-2009-3601-47

(Carta de consentimiento informado se incluye en el Anexo 1).

Toda investigación clínica que implique participación de individuos fue estrictamente confidencial y su identidad se mantuvo en secreto, el investigador se preocupó por la protección de los derechos, respeto, dignidad y bienestar de los sujetos participantes.

Los participantes con diagnóstico de asma alérgica fueron informados acerca de la investigación y decidieron libre y voluntariamente participar o no en el estudio y en cualquier momento pudieron abandonarlo, sin afectar el diagnóstico, tratamiento y la atención médica actual o futura.

Se les informó que se le tomaron 10mL de sangre periférica para el estudio de medición de citocinas, receptores y ligandos de quimiocinas. El único riesgo que se pudieron haber presentado fue dolor de unos segundos por la punción de la obtención de sangre, y en ocasiones y poco frecuente, se puede presentar un pequeño hematoma (moretón), que desaparece por si solo en unos días.

El estudio es importante porque nos permite conocer más de la enfermedad, para el futuro beneficio de los pacientes y los resultados obtenidos fueron utilizados para fines de investigación. De esta manera se pone de manifiesto el profundo respeto que se tiene por las personas, la vida y la seguridad de todos los pacientes.

RECURSOS PARA EL ESTUDIO

Cuenta con: 2 investigadores, médico alergólogo adscrito y el tesista. Los recursos materiales fueron proporcionados por los investigadores por lo que no se requirió de recursos financieros.

RESULTADOS

Participaron un total de 23 pacientes con asma alérgica, y se dividieron según su nivel de gravedad: 6 con asma Intermitente, 6 con Leve Persistente, 6 con Moderada Persistente y 5 con Grave Persistente.

El Grupo I (asmáticos obesos) estuvo conformado por 2 hombres y 10 mujeres, edad promedio de 38.5 años e IMC de 34.25.

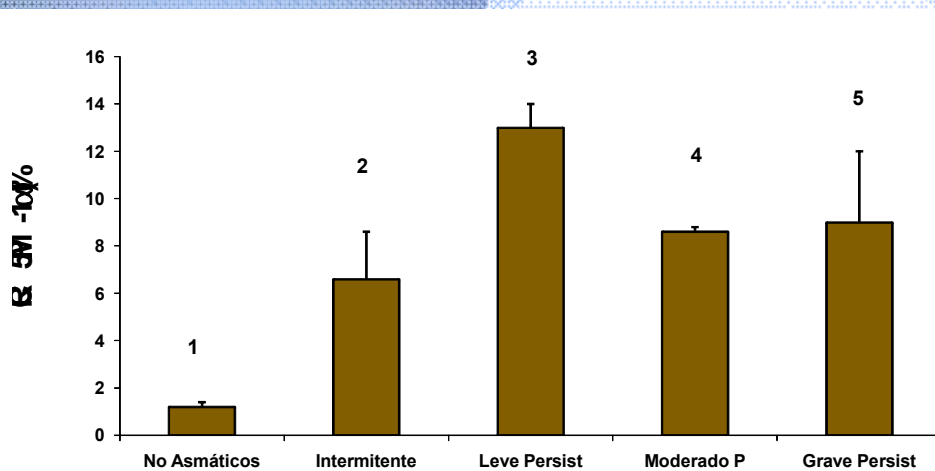
En Grupo II (asmáticos no obesos) se incluyeron 9 mujeres, con edad promedio de 35.5 años y un IMC de 21.33.

Grupo III (sujetos sanos) estuvo conformado por 4 hombres y 5 mujeres con edad promedio de 32.3 años.

Grupo IV (sujetos obesos no asmáticos) se incluyeron 1 hombre y 2 mujeres, edad promedio 30.1 con IMC de 30.75.

Se realizaron comparaciones en los pacientes asmáticos obesos y no obesos, entre las mediciones de los receptores de quimiocinas realizadas y sus ligandos con diferentes niveles de gravedad según GINA 2008.

Niveles de CCR5/MIP 1 α en Asmáticos Obesos en Comparación a Obesos No Asmáticos

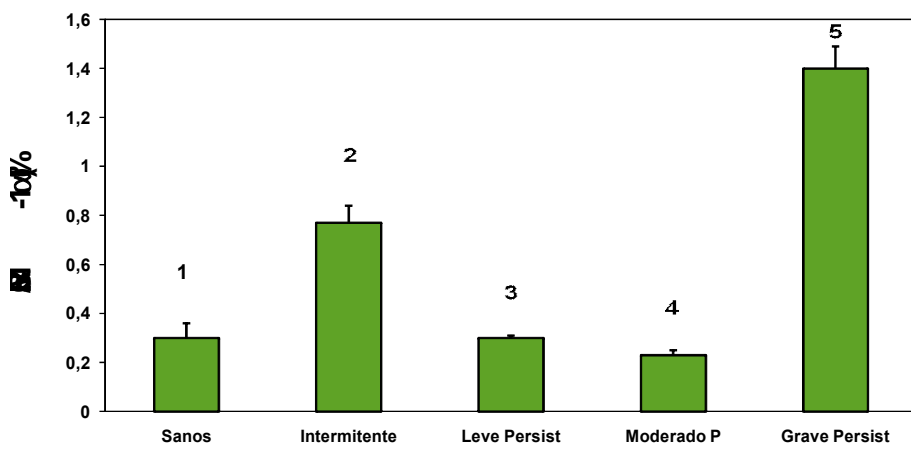


1 vs 2, 3, 4, 5	p<0.05	3 vs 4	p<0.05
2 vs 3	p<0.05	3 vs 5	p<0.05
2 vs 4	NS	4 vs 5	NS
2 vs 5	NS		

NS: No significativo

En pacientes asmáticos obesos, CCR5/MIP-1 α fue mayor en comparación con los obesos no asmáticos ($p<0.05$), y fue particularmente mayor en los asmáticos clasificados como leve persistente.

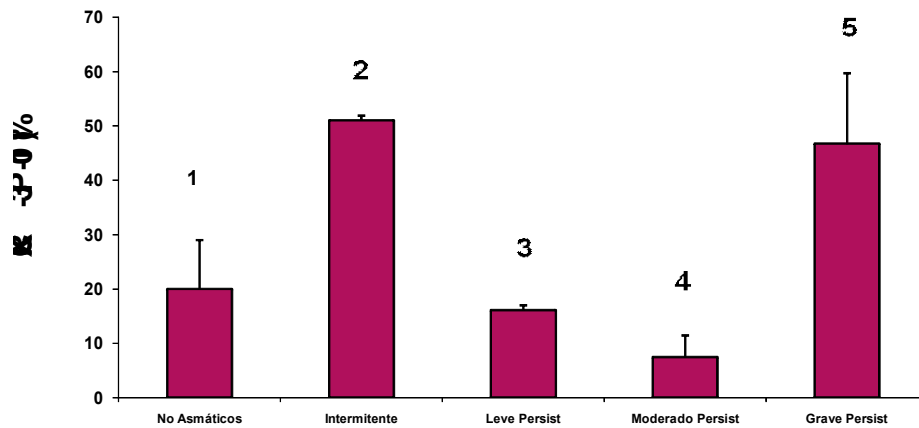
Niveles de CCR5/MIP 1 α en Asmáticos No Obesos en Comparación a Sanos



1 vs 2 p<0.05 2 vs 4 p<0.05
1 vs 3 p<0.05 2 vs 5 p<0.05
1 vs 4 p<0.05 3 vs 4 p<0.05
1 vs 5 p<0.05 3 vs 5 p<0.05
2 vs 3 p<0.05 4 vs 5 p<0.05

En los asmáticos no obesos, CCR5/MIP-1alfa tuvo un incremento significativamente mayor en pacientes con asma grave persistente en comparación a los sanos ($p < 0.05$).

Niveles de CXCR3/IP-10 en Asmáticos Obesos en Comparación a Obesos No Asmáticos

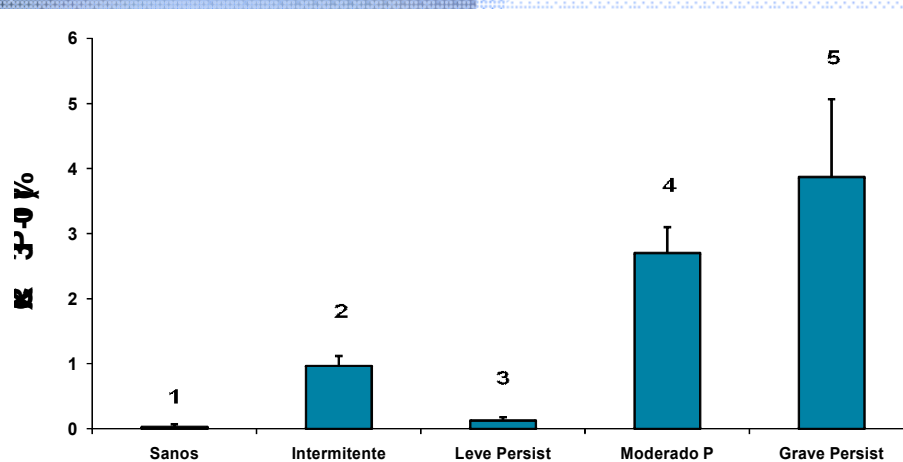


1 vs 2	p<0.05	2 vs 4	p<0.05
1 vs 3	NS	2 vs 5	NS
1 vs 4	p<0.05	3 vs 4	p<0.05
1 vs 5	NS	3 vs 5	p<0.05
2 vs 3	p<0.05	4 vs 5	p<0.05

NS: NO significativo

En pacientes obesos con asma Intermitente y Grave Persistente, CXCR3/IP-10 se encontró incrementada significativamente en comparación a los obesos no asmáticos y los pacientes con asma Leve Persistente y Moderada Persistente ($p < 0.05$).

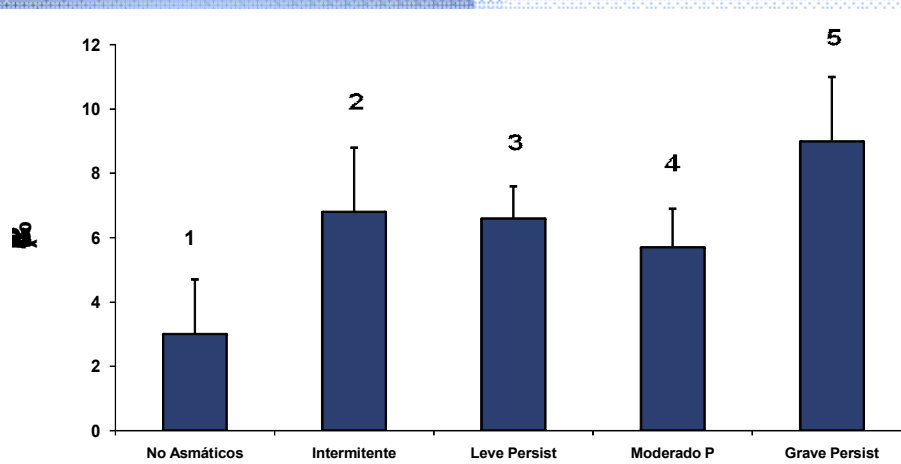
Niveles de CXCR3/IP-10 en Asmáticos No Obesos en Comparación a Sanos



1 vs 2 p<0.05	2 vs 4 p<0.05
1 vs 3 p<0.05	2 vs 5 p<0.05
1 vs 4 p<0.05	3 vs 4 p<0.05
1 vs 5 p<0.05	3 vs 5 p<0.05
2 vs 3 p<0.05	4 vs 5 NS

Hubo diferencia significativa entre los porcentajes de CXCR3/IP-10 de los pacientes asmáticos no obesos y los sujetos sanos ($p < 0.05$), independientemente de la gravedad del asma.

Niveles de CCR4 en Asmáticos Obesos en Comparación a Obesos No Asmáticos

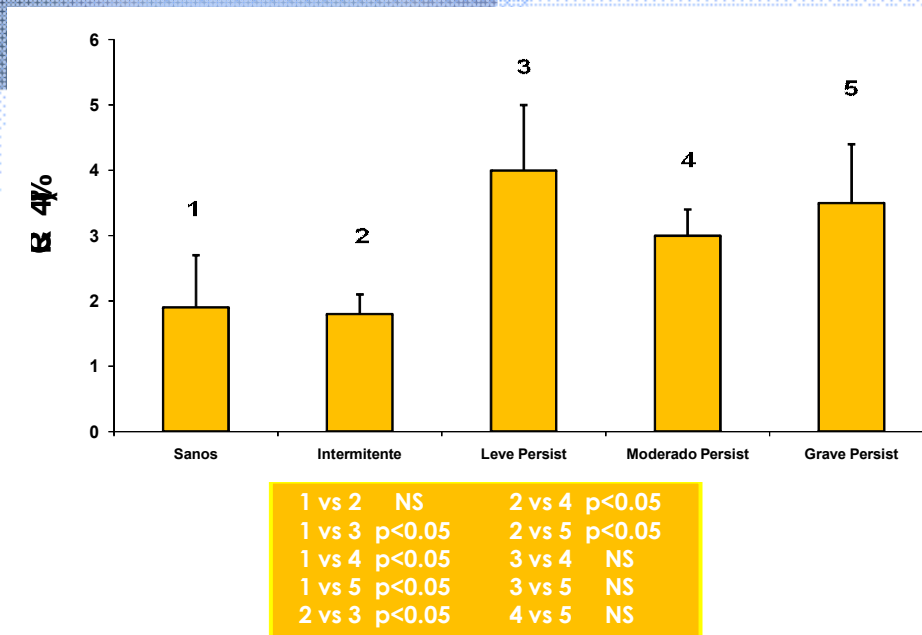


1 vs 2 p<0.05 3 vs 4, 5 NS
1 vs 3, 4, 5 p<0.05 4 vs 5 NS
2 vs 3, 4, 5 NS

NS: No significativo

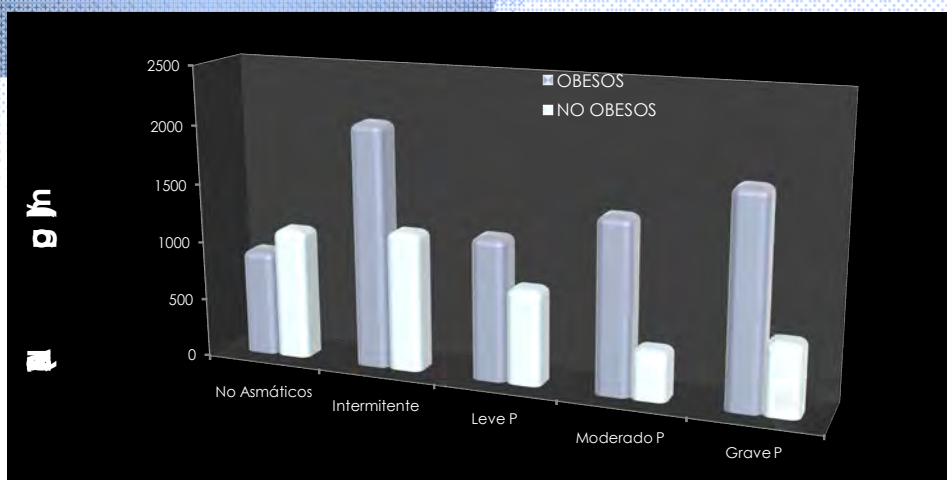
La expresión de CCR4 mostró diferencia significativa entre asmáticos obesos y sujetos obesos no asmáticos ($p < 0.05$) y fue particularmente mayor en los asmáticos clasificados como asma leve intermitente y asma grave persistente.

Niveles de CCR4 en Asmáticos No Obesos en Comparación a Sanos



En los asmáticos no obesos, hubo un incremento significativo de CCR4 en comparación a los sanos ($p < 0.05$), excepto en el caso de los pacientes con asma intermitente cuya diferencia no fue significativa.

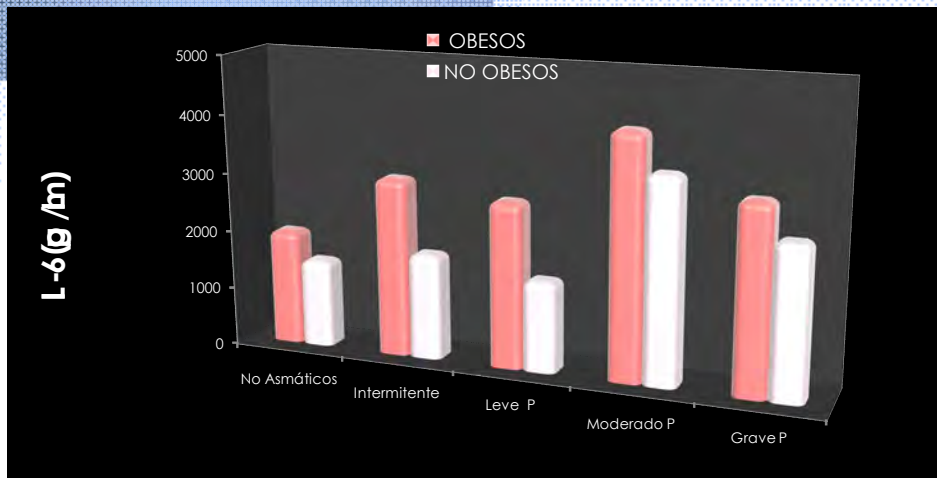
Niveles de Resistina en Asmáticos Obesos y No Obesos en Comparación a No Asmáticos



	<u>No</u> <u>Asmáticos</u>	<u>Intermitente</u>	<u>Leve P</u>	<u>Moderado P</u>	<u>Grave P</u>
OBESOS	914	2076	1217	1481	1795
NO OBESOS	1120	1190	815	427	612

Al asociar las concentraciones séricas de adipocinas séricas con los niveles de gravedad y el índice de masa corporal, se observó que la mayor concentración de la principal adipocina proinflamatoria, resistina, se obtuvo en el paciente obeso con Asma Intermitente, con un promedio de 2076.3 pg/mL (media \pm 1 desviación estándar), seguido de los obesos con asma Grave Persistentes con promedio de 1795.5 pg/mL (media \pm 1 desviación estándar).

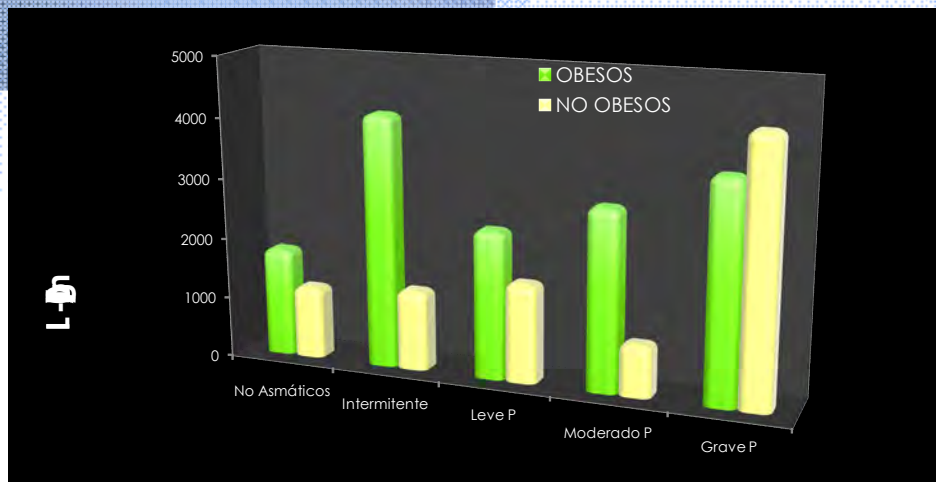
Niveles de IL-6 en Asmáticos Obesos y No Obesos en Comparación a No Asmáticos



	<u>No</u> <u>Asmáticos</u>	<u>Intermitente</u>	<u>Leve P</u>	<u>Moderado P</u>	<u>Grave P</u>
OBESOS	1975	3042	2823	4125	3183
NO OBESOS	1500	1800	1552	3474	2582

Todos los pacientes asmáticos obesos, independientemente del grado de severidad de su enfermedad, mostraron elevados niveles de IL-6 en comparación con los pacientes asmáticos no obesos: Intermitentes (3042.5 vs 1800 pg/mL); Leve Persistente (2823 vs 1552 pg/mL); Moderada Persistente (4125 vs 3474 pg/mL) y Grave Persistente (3183 vs 2582 pg/mL).

Niveles de IL-10 en Asmáticos Obesos y No Obesos en Comparación a No Asmáticos



	<u>No</u> <u>Asmáticos</u>	<u>Intermitente</u>	<u>Leve P</u>	<u>Moderado P</u>	<u>Grave P</u>
OBESOS	1800	4152	2435	2962	3591
NO OBESOS	1200	1325	1631	855	4292

Las concentraciones de IL-10 se encontraron particularmente más elevadas en los pacientes obesos con asma grave persistente, en obesos (3591pg/mL) y los no obesos (4292pg/mL). Además, las concentraciones fueron mayores en obesos intermitentes en comparación a no obesos (4152 vs 1325 pg/mL). En general, los resultados muestran un incremento en IL-10 en obesos asmáticos en comparación a no obesos.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados mostraron que la sobre expresión de los receptores de quimiocinas CCR4, CCR5 y CXCR3 tienen una relación estrecha con las altas concentraciones de resistina e IL-6 en especial en pacientes obesos con el tipo de asma leve y severa, esta misma asociación fue descrita por Kopp *et al*²⁹, al encontrar una relación proporcional entre concentración de IL-6 y resistina y la inducción de la proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1).

CCR5/MIP-1alfa se encuentra sobre regulada en tejido adiposo o subcutáneo en obesos, además se identificó en lavado broncoalveolar como uno de los principales receptores y ligandos de quimiocinas en pacientes con asma severa.¹⁹ La mayor concentración que encontramos fue precisamente en los pacientes con asma grave persistente, lo que nos puede indicar que tanto en lavado broncoalveolar como en sangre periférica, los niveles de CCR5/MIP-1alfa se encuentran elevados en pacientes con asma severa. Éste receptor y ligando pueden servir en un futuro como marcadores de gravedad del asma alérgica.

CXCR3/IP-10 se encuentra sobre regulado en el pulmón alérgico.¹⁵ Esto se demostró principalmente en los asmáticos no obesos ya que todos presentaron mayores concentraciones en comparación con los sanos. En los asmáticos obesos solo los Intermitentes y Grave Persistentes se encontraron con concentraciones significativamente más elevadas que los obesos no asmáticos. Con esto concluimos que CXCR3/IP-10 se encuentra en concentraciones más elevadas en asmáticos alérgicos que en los individuos sanos, y que puede ser utilizado como un marcador de asma alérgica a futuro.

CCR4 se relaciona con el reclutamiento de células T, así como en el remodelamiento de las vías respiratorias.²⁰ Nuestro estudio mostró un incremento en todos los pacientes asmáticos obesos y no obesos en comparación a los individuos sanos y obesos no asmáticos, excepto en pacientes asmáticos intermitentes no obesos. A futuro CCR4 puede ser útil como marcador de remodelación.

Kim *et al*³⁰ y Larochelle *et al*³¹, encontraron una predicción negativa entre los altos niveles de resistina en sueros de pacientes pediátricos obesos con asma, en contraste con individuos sanos, estos estudios al igual que el nuestro, sugieren una estrecha asociación entre obesidad, inflamación y la severidad del asma, en especial con las concentraciones encontradas de resistina. Esta asociación entre altas concentraciones de resistina en relación con la severidad del asma, obtenidas en nuestro estudio están acorde a los reportados *in vivo* en ratones hechos por Mishra *et al*³², encontrando que la resistina e IL-13, generan inflamación en las vías aéreas y conducen a la remodelación pulmonar, induciéndose el depósito de fibras de colágeno de forma perivascular y peribroquial. Además de que es posible que resistina, adipocinas, IL-6 e IL-10 puede ser que sean inducidas por diversos alérgenos tipo independiente de tipo T_H2, con efectos biológicos y clínicos exacerbados en el paciente con asma.

Actualmente, diversos investigadores están utilizando la estrategia de bloquear selectivamente el reclutamiento leucocitario al sitio de inflamación (quimiocinas) como una medida para tratar enfermedades, incluyendo el asma alérgica. El uso de pequeñas moléculas inhibitorias de receptores de quimiocinas podrán tener un efecto terapéutico en pacientes asmáticos obesos.¹³

CONCLUSIONES

CCR5/MIP-1alfa □se encuentran elevada en pacientes con asma alérgica grave, pueden servir en un futuro como marcadores de severidad del asma. Se requiere de incrementar el tamaño de muestra para comprobar ésta hipótesis.

CXCR3/IP-10 se encuentra en concentraciones más elevadas en asmáticos alérgicos independientemente de su peso corporal en comparación a los individuos sanos, y que puede ser utilizado como un marcador de presencia de asma alérgica.

A futuro CCR4 puede ser considerado útil como marcador de remodelación en pacientes asmáticos independiente de su peso corporal.

Existe una estrecha asociación entre obesidad, inflamación y la gravedad del asma que puede traducirse en el incremento de las concentraciones de resistina e IL-6.

IL-10 se incremento en todos los grupos de pacientes regulando la respuesta anti-inflamatoria.

R E F E R E N C I A S

1. Segura NH, Hernández L, Velázquez C, et al. Asma y obesidad: enfermedades inflamatorias relacionadas. *Rev Alergia Mex* 2007;54(1):24-28
2. Mendoza A, Romero J, Pena H, et al. Prevalence of asthma in school children from Mexican city Hermosillo. *Gac Med Mex* 2001;137(5):397-401
3. www.inegi.gob.mx
4. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. 2008
5. Segura NH, Salas RM, et al. Estudio descriptivo de la morbilidad y mortalidad por asma en una institución de salud. *Alergia México* 1994; 41(2):42-45
6. Vargas MH, et al. Trends of Asthma in México. *Chest* 2004;125:1993-1997
7. Huber J, Kiefer FW, Zeyda M et al. CC Chemokine and CC Chemokine Receptor Profiles in Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Are Altered in Human Obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3215–3221
8. Sutherland ER. Obesity and Asthma. *Immunol Allergy Clin N Am* 2008;28:589–602
9. Blanco A. Obesidad y respuesta inflamatoria. *Bol Pediatr* 2007;47:237-249
10. Hersoug LG, Linneberg A. The Link between the epidemics of obesity and allergic diseases: does obesity induce decreased immune tolerance? *Allergy* 2007;62:1205-1213
11. Levinson SS. Inflammatory and Long-term Risk Markers. *Clin Lab Med* 2006;26:553–570
12. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins. *Patología Estructural y Funcional*. 6º Edición. McGraw Hill-Interamericana. 2000.
13. Carrillo-Díaz T, Martínez-Tadeo JA, Cumplido-Bonny JA. Diferentes tipos de respuesta inflamatoria en el asma. *Arch Bronconeumol*. 2006;42(1):13-9
14. Dong VM, McDermott DH, Abdi R. Chemokines and diseases. *Eur J Dermatol* 2003;13:224-30
15. Pease JE, Williams TJ. Chemokines and their receptors in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:305-18
16. Hartl D, Lee CG, Da Silva CA, et al. Novel biomarkers in asthma: chemokines and chitinase-like proteins. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009;9(1):60-66
17. De AK, Miller-Graziano CL, Calvano SE, et al. Selective activation of peripheral blood T cell subsets by endotoxin infusion in healthy human subjects corresponds to differential chemokine activation. *J Immunol* 2005;175:6155-6162

18. Murdolo G, Hammarstedt A, Sandqvist M, et al. Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Subcutaneous Abdominal Adipose Tissue: Characterization of Interstitial Concentration and Regulation of Gene Expression by Insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2688–2695
19. Brasier AR, Sundar V, Boetticher G, et al. Molecular phenotyping of severe asthma using pattern recognition of bronchoalveolar lavage–derived cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:30-7
20. Castells M. Mast Cell Mediators in Allergic Inflammation and Mastocytosis. *Immunol Allergy Clin N Am* 2006;26:465–485
21. Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1303-10
22. Méndez JI, Huerta JG, Bellanti JA, et al. *Alergia Enfermedad Multisistémica*. 1ª Edición. Editorial Médica Panamericana. 2008
23. Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2001;18:34,50s-59s
24. Sánchez-Muñoz F, García-Macedo R, Alarcón-Aguilar F, et al. Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gac Méd Méx* 2005;141:505-512
25. Steinke JW, Borish L. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:S441-5
26. Miller AL, Lukacs NW. Chemokine receptors: understanding their role in asthmatic disease. *Immunol Allergy Clin N Am* 2004;24:667–683
27. [Lee JS](#), [Kim IS](#), [Ryu JS](#), [Yun CY](#). House dust mite, *Dermatophagoides pteronissinus* increases expression of MCP-1, IL-6, and IL-8 in human monocytic THP-1 cells. *Cytokine* 2008 Jun;42(3):365-71
28. WHO. Programme of Nutrition, Family and Reproductive Health. Obesity. Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Ginebra, 3-5, June 1997. Ginebra WHO,1998
29. Kopp A, Buechler C, Neumeier M, et al. Innate Immunity and Adipocyte Function: Ligand-specific Activation of Multiple Toll-like Receptors Modulates Cytokine, Adipokine, and Chemokine Secretion in Adipocytes. *Obesity* 2009;17(4):648-56.
30. Kim KW, Shin YH, Lee KE, et al. Relationship between adipokines and manifestations of childhood asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2008;19(6):535-40.
31. Larochelle J, Freiler J, Dice J, Hagan L. Plasma resistin levels in asthmatics as a marker of disease state. *J Asthma* 2007;44(7):509-13.
32. Mishra A, Wang M, Schlotman J, et al. Resistin-like molecule-beta is an allergen-induced cytokine with inflammatory and remodeling activity in the murine lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293(2):L303-4

A N E X O S



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
“DR. BERNARDO SEPULVEDA G.”
SERVICIO DE ALERGIA E INMUNOLOGICA CLINICA

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Lugar y fecha: _____

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación **RELACIÓN DE LOS NIVELES DE QUIMIOCIAS Y CITOCINAS EN PACIENTES ADULTOS ASMÁTICOS OBESOS Y NO OBESOS CON DIFERENTES NIVELES DE SEVERIDAD**, registrado ante el H. Comité Local de Investigación con el número R-2009-3601-47. El objetivo de esta investigación es conocer la prevalencia de diversas especies de Ácaros en pacientes con alergia respiratoria que residen en el Distrito Federal.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en la toma de una muestra de 15 ml de sangre para conocer el comportamiento de las sustancias descritas, que podrían favorecer la inflamación de las vías respiratorias.

Declaro:

que se me ha informado ampliamente sobre los posibles efectos adversos de las pruebas cutáneas, que ocurren en menos del 1 % de los pacientes son: edema local, prurito local, exacerbación de mis síntomas y serán vigilados por el investigador.

El investigador principal se ha comprometido a proporcionarme los resultados de la investigación, los cuales serán confidenciales.

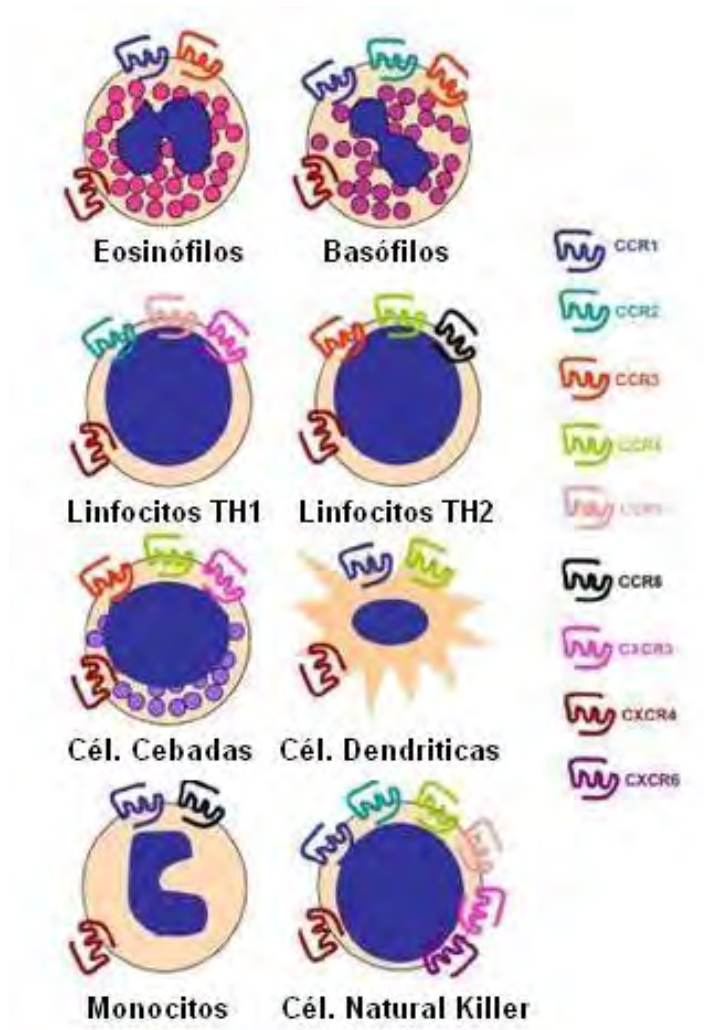
Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto y el tratamiento que debo recibir.

INVESTIGADOR PRINCIPAL

PACIENTE

TESTIGO

TESTIGO



J Allergy Clin Immunol 2006;118:305-18

Anexo 2: Los receptores de quimiocinas de los leucocitos involucrados en la patogénesis de enfermedades alérgicas.

Clasificación de Gravedad



Clasificación	Síntomas respiratorios	Función pulmonar
Intermitente	<ul style="list-style-type: none"> • < 1 vez por semana • Exacerbaciones breves. • Nocturnos < 2 veces por mes 	<p>FEV1 o PEF > 80%</p> <p>Variabilidad del FEV1 o PEF < 20%</p>
Leve persistente	<ul style="list-style-type: none"> • > 1 vez a semana < 1 vez al día. • Exacerbaciones pueden afectar la actividad y el sueño. • Despertares nocturnos > 2 veces al mes. 	<p>FEV1 o PEF > 80%</p> <p>Variabilidad del FEV1 o PEF 20-30%.</p>
Moderada persistente	<ul style="list-style-type: none"> • Síntomas diariamente. • Exacerbaciones pueden afectar la actividad y el sueño. • Despertares nocturnos > 1 vez a la semana. • Uso diario de β2-agonista acción rápida 	<p>FEV1 o PEF 60 – 80%</p> <p>Variabilidad del FEV1 o PEF > 30%</p>
Grave persistente	<ul style="list-style-type: none"> • Síntomas diariamente. • Exacerbaciones frecuentes. • Despertares frecuentes. • Limitación de actividades físicas 	<p>FEV1 o PEF < 60%.</p> <p>Variabilidad FEV1 o PEF > 30%</p>

Global Initiative for Asthma (GINA) 2008

Anexo 3. Clasificación de Gravedad de asma según las guías de GINA 2008.

Quimiocinas Realizadas

Receptores de Quimiocinas	Ligandos Asociados	Tipos Células que Expresan el Receptor	Evidencia Clínica en Alergia
CXCR3	CXCL10 o IP-10 CXCL9 o MIG CXCL11 o I-TAC	T_H1 , Linfocitos B, Células Cebadas, Células T Natural Killer	CXCL9, CXCL10 y CXCL11 son activadas por células epiteliales pulmonares y linfocitos T pulmonares. CXCR3 es sobre regulado en pulmón alérgico
CCR4	TARC CCL17 CCL22	T_H2 , Células cebadas, Células dendríticas, Células T Natural Killer	Reclutamiento de células T. Remodelamiento de vías respiratorias. Destrucción de esporas de hongos
CCR5	CCL3 o MIP-1α CCL4 CCL5	T_H1 , Células cebadas, Células T Natural Killer	Reclutamiento de células dendríticas inmaduras hacia los tejidos inflamatorios. Sobre regulada en tejido adiposo en obesos. MIP 1α se ha identificado en lavado broncoalveolar en pacientes con asma severa

IP-10: Proteína Interferón Inducible-10

Immunol Allergy Clin N Am 2004;24:667-683

Anexo 4: Receptores y Ligandos de Quimiocinas realizadas y sus características.

Citocinas Realizadas

Citocinas	Son Secretados por:	Función
IL-6	Linfocitos, Macrófagos, Fibroblastos, Células endoteliales, Músculo esquelético y Tejido adiposo (Adipocitos)	Pro-inflamatoria actuando vía dependiente de NF-kB
IL-10	Linfocitos T _H 2 (en pequeñas cantidades), Células T citotóxicas, Linfocitos B, Células cebadas, Células dendríticas, Linfocitos T reguladores	Inhibe la producción de IFN-gamma e IL-2 de los linfocitos T _H 1; IL-4 e IL-5 de los linfocitos T _H 2; TNF-alfa de los fagocitos mononucleares; e IFN-gamma y TNF-alfa por las células NK
Resistina	Tejido adiposo blanco (Adipocitos)	Pro-inflamatoria Activa los macrófagos, liberando citocinas proinflamatorias (TNF-alfa, IL-12)

TNF-alfa: Factor de Necrosis Tumoral-alfa

J Allergy Clin Immunol 2006;117:3441-

Anexo 5. Citocinas realizadas y sus características.

PACIENTES ASMÁTICOS Y SUS CARACTERÍSTICAS

OBESOS	SEXO	EDAD	PESO (kgs)	TALLA (mts)	IMC	CLASIFICACIÓN DE SEVERIDAD
1- DRP	1	24	73	1.56	30	1
2- IAE	2	38	119	1.92	32	1
3- SAMP	1	43	74	1.58	30	1
4- ROM	1	29	75	1.59	30	2
5- TEC	2	33	80	1.62	30	2
6- BLA	1	35	90	1.54	38	2
7- EDT	1	65	79	1.63	30	3
8- MGMG	1	34	81	1.51	35	3
9- GC	1	40	153	1.68	54	3
10- LES	1	39	91	1.55	37	4
11- MM	1	37	105	1.73	35	4
12- FSN	1	45	77	1.61	30	4

NO OBESOS	SEXO	EDAD	PESO (kgs)	TALLA (mts)	IMC	CLASIFICACIÓN DE SEVERIDAD
1- AJML	1	43	53	1.58	21	1
2- VCAL	1	27	52	1.54	24	1
3- GVCV	1	64	57	1.66	20	1
4- VNJ	2	28	63	1.65	23	2
5- MDR	1	55	45	1.5	20	2
6- SMRI	1	18	46	1.47	21	2
7- JVM	1	35	54	1.54	22	3
8- GGC	1	22	47	1.51	20	3
9- DGE	1	40	63	1.6	24	3
10- CAS	1	31	60	1.68	21	4
11- RDRT	2	32	60	1.7	20	4
12- RDRT	2	32	60	1.7	20	4

SEXO:

1= MUJER 2=HOMBRE

CLASIFICACIÓN DE GRAVEDAD SEGÚN

GINA 2008:

1- INTERMITENTE, 2- LEVE PERSISTENTE, 3- MODERADO PERSISTENTE, 4- GRAVE PERSISTENTE

PROMEDIOS EN **EDAD** **PESO** **TALLA** **IMC**

OBESOS

38.5 91.416666 1.5015384 34.25

PROMEDIOS EN NO

OBESOS

35.583333 55 1.5941666 21.333333

PROMEDIO DE AMBOS

37.041666 73.208333 1.6104166 27.791666

PROMEDIO DE IMC POR NIVEL DE GRAVEDAD

	INTERMITENTE	LEVE PERSIST	MOD PERSIST	GRAVE PERSIST
NO				20.333333
OBESOS	21.666667	21.333333	22	3
OBESOS	30.666667	32.666667	39.666667	34