



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“PERFIL DE EXPRESIÓN DE LOS GENES CCL2, CCL8 Y CXCL2 EN
BIOPSIAS BRONQUIALES DE SUJETOS CON ENFERMEDAD
RESPIRATORIA EXACERBADA POR ASPIRINA (EREA)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ADRIÁN ASael RODRÍGUEZ CORTÉS



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Fernando Montiel Jesús Aguirre.

VOCAL: Patricia Elvira Berrón Ruiz.

SECRETARIO: Ma. Cristina Negrete García.

1er SUPLENTE: Ignacio Páramo Rodríguez.

2do SUPLENTE: Vanessa Maya Ampudia.

Sitio donde se desarrollo el tema:

El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio de Inmunología y Asma, del Departamento de Investigación en Inmunogenética y Alergia, en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, “Dr. Ismael Cosío Villegas”.

Asesora

M. en C. Ma. Cristina Negrete García

Sustentante

Adrián Asael Rodríguez Cortés.

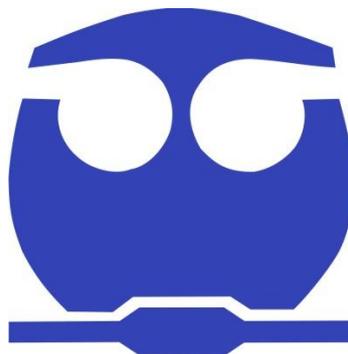
El presente trabajo fue realizado en el:

Laboratorio de Inmunoalergia y Asma

Departamento de Investigación en Inmunogenética y Alergia

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Bajo la dirección de la M. en C. Ma. Cristina Negrete García



ABREVIATURAS.....	1
1-. ANTECEDENTES.....	2
2-. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1-. Ácido acetilsalicílico (Aspirina)	3
2.2-. Mecanismo de acción del ácido acetilsalicílico	3
2.3.- Enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina (EREA)	5
2.4-. Rinitis.....	6
2.5-. Pólipos nasales.....	7
2.6-. Asma	8
2.7-. Respuesta inflamatoria en Asma y EREA.....	9
2.8-. Desarrollo de la EREA.....	12
2.8.1-. Mecanismo de patogénesis de la EREA.....	13
2.8.2.- Metabolismo del ácido Araquidónico (AA).....	15
2.8.3-. Prevalencia de la EREA	17
2.9-. Diagnóstico de la EREA	18
2.10-. Quimiocinas	20
2.10.1-. Quimiocinas en enfermedades inflamatorias.	25
2.10.2-. Quimiocina CCL2	25
2.10.3-. Quimiocina CCL8	27
2.10.4-. Quimiocina CXCL2	27
2.11-. EREA y quimiocinas	28
3-. JUSTIFICACIÓN.....	33
4-. OBJETIVOS	35
4.1-. Objetivo general.....	35
4.2-. Objetivos específicos	35
5-. MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
5.1-. Grupos de estudio	36
5.2-. Reto nasal y broncoscopía.....	37
5.3-. Extracción de RNA total de Biopsias Bronquiales	38
5.4-. Cuantificación y análisis de la calidad del RNA total	40
5.5-. Síntesis de DNA complementario (cDNA).	44
5.6-. PCR en tiempo real, para análisis de expresión relativa de los genes CCL2, CCL8 y CXCL2.	46

5.6.1-	Fundamento de la técnica de PCR en tiempo real	46
5.6.2-	Sondas TaqMan [®] , como sistema de detección para PCR en tiempo real; fundamento.	51
6-	PROCESO DE OBTENCIÓN DE RESULTADOS.....	53
6.1-	Validación ⁽⁵⁸⁾	54
6.2-	Expresión relativa de los genes CCL2, CCL8 y CXCL2 empleando el método C _T comparativo ($\Delta\Delta C_T$) ^(59, 60)	57
7-	RESULTADOS.....	60
7.1-	Datos demográficos	60
7.2-	Selección de Grupos de Estudio para validación por RT-PCR tiempo real	60
7.3-	Expresión relativa del gen CCL2 empleando el método C _T comparativo ($\Delta\Delta C_T$).	61
7.4-	Expresión relativa del gen CCL8 empleando el método C _T comparativo ($\Delta\Delta C_T$).	63
7.5-	Expresión relativa del gen CXCL2 empleando el método C _T comparativo ($\Delta\Delta C_T$).	65
8-	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	67
9-	CONCLUSIONES	75
10-	BIBLIOGRAFÍA	76

ABREVIATURAS

EREA	Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina.
AINES	Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos.
ATA	Asmáticos tolerantes a Aspirina.
AA	Ácido araquidónico.
C _T	(Threshold cycle), en PCR, ciclo umbral de detección.
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica.
COX	Prostaglandina-sintasa de endoperóxido o Ciclooxygenasa de ácidos grasos.
CCL	Quimiocina (motivo C-C) ligando.
CXCL	Quimiocina (motivo C-X-C) ligando.
cys-L	Cisteinil-leucotrienos.
cDNA	DNA complementario.
$\Delta\Delta CT$	Método de C _T comparativo.
FEV	Volumen espiratorio forzado.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.
LOX	Lipooxygenasa.
HBR	Hiperreactividad bronquial.
IL	Interleucina.
L-ASA	Lisil-aspirina.
LBA	Lavado bronquioalveolar

1-. ANTECEDENTES

La Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina (en adelante EREA) es un fenotipo de Asma cuyo síndrome clínico está asociado con inflamación severa y crónica de las vías respiratorias superiores e inferiores, dando lugar a rinitis crónica, sinusitis, pólipos recurrentes y asma que es desencadenada después de la ingesta de aspirina y algunos otros Antiinflamatorios no Esteroideos (en adelante AINES) que inhiben a las enzimas COX1 y COX2 ⁽¹⁾. Actualmente se considera a la sinusitis hiper-eosinofílica crónica (SHCH), como un cuarto elemento para su caracterización⁽¹⁴⁾.

La EREA fue descrita por primera vez por Widal en 1922 ⁽²⁾ quien realizó la asociación clínica entre hipersensibilidad a la aspirina y poliposis nasal; posteriormente en 1968, Samter & Beer ⁽³⁾, publicaron los primeros trabajos encaminados a elucidar esta asociación, a la cual denominaron “Triada de Samter” o “Síndrome de Samter”.

El mecanismo de patogénesis aún no se conoce, sin embargo, la hipótesis que hasta ahora ha sido mejor aceptada es la que involucra diferentes anomalías en el metabolismo del ácido araquidónico ^(4, 14) (en adelante AA), en el cual la aspirina bloquea la vía de la COX-1 favoreciendo la síntesis de cisteinil Leucotrienos (cys-L) por la vía de la Lipooxigenasa (LOX), que colaboran en la respuesta inflamatoria de las vías respiratorias tanto inferiores como superiores⁽¹⁾.

2-. INTRODUCCIÓN

2.1-. *Ácido acetilsalicílico (Aspirina)*

El ácido acetilsalicílico es comercializado como “Aspirina” por los laboratorios Bayer. Dicho principio activo, el ácido acetyl salicílico, fue descubierto en 1897 por Félix Hoffman. Tiene varias propiedades terapéuticas como analgésicas, antiinflamatorias, antipiréticas y como protector vascular. Es el primer fármaco de la familia de los AINEs cuyo mecanismo de acción es la inhibición de las enzimas COX-1 y COX-2 ⁽⁵⁾.

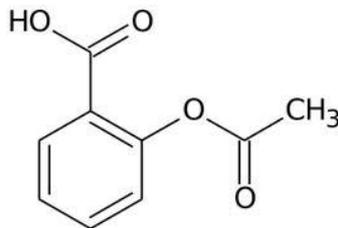


Figura 1. Estructura química del ácido acetilsalicílico.

2.2-. *Mecanismo de acción del ácido acetilsalicílico*

El mecanismo de acción de aspirina, radica en la inhibición irreversible de la enzima prostaglandina-sintasa de endoperoxido o ciclooxigenasa de ácidos grasos (en adelante COX)⁽⁵⁾. La COX es una enzima que interviene en la formación de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico, liberado de los lípidos que forman parte de la membrana celular por acción de la fosfolipasa A1⁽⁵⁾. Se conoce la existencia de, al menos, dos isoformas mayores de COX:

- La COX-1(Prostaglandina sintasa de endoperoxido 1, codificada en el cromosoma 9): cuya expresión es constitutiva en ciertas células en las que se expresa de forma relativamente permanente, controlando la

síntesis de eicosanoides implicados en la regulación de numerosas funciones fisiológicas⁽⁵⁾.

- La COX-2 (Prostaglandina sintasa de endoperoxido 2, codificada en el cromosoma 1): que es inducible, es decir, de expresión más restringida en condiciones basales (salvo en algunos tejidos) pero rápidamente aumentada bajo ciertos estímulos, particularmente inflamatorios, también interviene en la producción de prostaglandinas en situaciones fisiológicas y patológicas⁽⁵⁾.

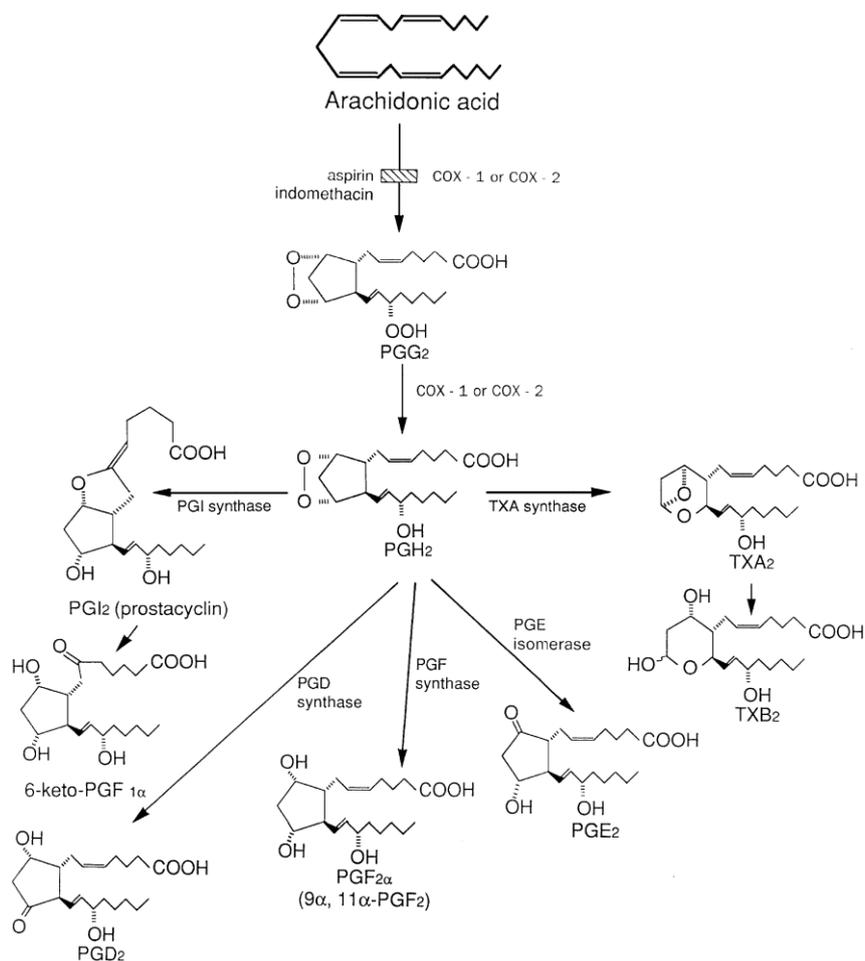


Figura 2. Metabolismo del Acido Araquidónico.

2.3.- Enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina (EREA)

Desde su descubrimiento en 1897, el ácido acetilsalicílico, comercializado como aspirina, se ha convertido en uno de los medicamentos de venta libre más utilizados y recetados en el mundo debido a sus conocidos efectos analgésicos y antiinflamatorios, entre otros. Generalmente la aspirina es bien tolerada por la mayoría de las personas, sin embargo, se han descrito varios efectos adversos asociados con el consumo de este fármaco, y uno de esos efectos adversos es la EREA⁽³⁾.

La EREA se ha descrito como un fenotipo de asma caracterizado por episodios de hiperreactividad bronquial (HBR) severos ocasionados por la ingesta de aspirina y otros AINES^(3, 8).

Su descubrimiento y caracterización clínica comienza en el año de 1922, donde Widal y sus colaboradores fueron los primeros en describir la asociación de intolerancia a la aspirina con la presentación de pólipos nasales y asma bronquial^(2, 14).

Cuarenta y cinco años después, en 1967, Samter y Beer definieron la “triada de la aspirina” como un síndrome que se caracteriza por intolerancia a la aspirina, asma bronquial y poliposis nasal, al cual nombraron síndrome de Samter⁽³⁾.

Esta enfermedad ha sido conocida por otros términos como, Asma Intolerante a Aspirina, asma sensible a aspirina, hipersensibilidad a la aspirina, idiosincrasia a la aspirina e intolerancia a la aspirina. Actualmente en la literatura existe la nomenclatura de enfermedad respiratoria exacerbada por

aspirina (EREA), y esta engloba todos los síntomas nasales y bronquiales exacerbados por el consumo de éste y otros AINES ⁽⁶⁾.

La EREA se define como un síndrome clínico asociado con inflamación severa y crónica de las vías respiratorias superiores e inferiores, dando lugar a rinitis crónica, sinusitis, pólipos recurrentes y asma bronquial^(3, 8, 14).

2.4-. Rinitis

La rinitis comprende una serie de afecciones determinadas por la presencia de inflamación de la mucosa nasal y que clínicamente se caracteriza por la presencia de obstrucción nasal, rinorrea y estornudos. La inflamación nasal puede afectar al vestíbulo nasal, a la fosa nasal e incluso extenderse a la mucosa de los senos paranasales ^(3, 7, 14).

La rinitis puede clasificarse siguiendo varios criterios:

- a) Por su etiología; en infecciosa, alérgica y hormonal.
- b) Por su patogenia; en inflamatoria mediada por IgE e inflamatoria no mediada por IgE.
- c) Por las características de la secreción nasal; en acuosa y mucosa.
- d) Por su evolución; en agudas y crónicas.

La rinitis característica de la EREA se encuentra dentro del grupo de rinitis crónica funcional ocasionada por intolerancia a antiinflamatorios ^(9, 10, 14).

Fisiológicamente la rinitis se describe como una reacción frente a un agresor en la cual se produce una vasodilatación con un aumento de la

permeabilidad capilar y extravasación plasmática responsable de edema y de la obstrucción nasal; un aumento de la secreción glandular responsable de la rinorrea; la estimulación de las terminaciones nerviosas sensitivas que produce los estornudos, prurito y la liberación de neuromediadores ^(10, 11, 14).

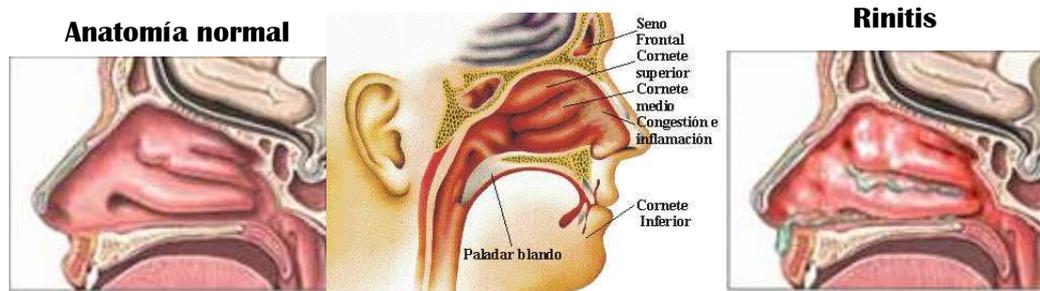


Figura 3. Características de la rinitis. Una inflamación de la capa mucosa nasal con secreción nasal.

2.5-. Pólipos nasales

Son entidades idiopáticas caracterizadas por proliferación de la mucosa nasal y/o de los senos paranasales de origen inflamatorio. Su presentación puede ser única o múltiple, pero de forma persistente ^(12, 11, 14).

Los pólipos nasales se clasifican en dos grupos: neutrofílicos y eosinofílicos. Los primeros se pueden observar en la fibrosis quística con una frecuencia alta de recurrencias, secreción purulenta con neutrofilia nasal y mala respuesta al tratamiento con esteroides ^(12, 14).

Los de tipo eosinofílico, son característicos en pacientes con rinitis alérgica, desarrollan rinorrea seromucosa y eosinofilia nasal. Estos generalmente presentan una buena respuesta a la aplicación de esteroides ^(12, 14).

La presencia de pólipos nasales se caracteriza por obstrucción nasal progresiva, rinorrea mucohialina o purulenta y dolor facial o cefalea, anosmia, prurito nasal, voz nasal, halitosis y facies de respirador oral. Al realizar una rinoscopia anterior se aprecian masas pálidas, grisáceas o a veces de color violáceo, redondas y de superficie lisa, la mayor parte se originan del meato medio, pueden ser múltiples y por lo general son bilaterales^(12, 14).

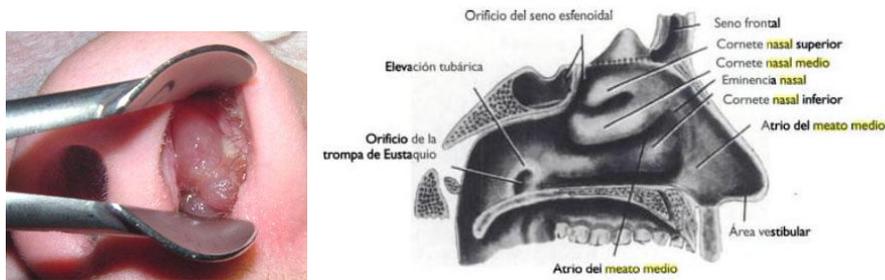


Figura 4. Presencia de pólipos nasales. Anatomía de orificio nasal donde se desarrollan los pólipos nasales.

2.6- Asma

El asma es un desorden inflamatorio crónico de las vías respiratorias, se caracteriza por la constricción muscular de duración variable de los conductos respiratorios (espasmo respiratorio) y la aparición de sibilancias al respirar, tos, expectoración, opresión torácica y disnea^(13, 14, 15).

Esta inflamación crónica observada en el asma involucra una compleja interacción de células y mediadores que conducen a la formación de lesiones histopatológicas caracterizadas por un incremento en la producción de moco, obstrucción de vías aéreas, contracción del músculo liso, edema, descamación de células epiteliales e infiltrado inflamatorio^(14, 15).

La naturaleza causal del asma y las razones de su severidad no se han establecido adecuadamente; se trata de una enfermedad multifactorial, donde las condiciones ambientales desempeñan un papel importante. Se han realizado estudios que explican la naturaleza causal con interacciones de mecanismos neurales, inflamatorios donde intervienen diferentes células como mastocitos o células cebadas, macrófagos, eosinófilos, linfocitos y neutrófilos, mediadores como histamina, leucotrienos, entre otros, anormalidades en el músculo liso y de la ruta del ácido araquidónico ^(14, 15).

2.7-. Respuesta inflamatoria en Asma y EREA.

La inflamación de las vías aéreas en el asma, ocasionada por procesos inmunológicos se caracteriza por la proliferación y activación de una subpoblación de linfocitos T, las células CD4⁺ cooperadoras tipo 2 (T_H2), capaces de secretar numerosas citocinas y contribuir a la regulación y activación de células efectoras o proinflamatorias que liberan mediadores y oxidantes al entorno para contribuir con el daño e inflamación que ocurre durante un ataque de asma ⁽¹³⁾.

En el asma las principales células efectoras de esta enfermedad son los mastocitos y eosinófilos ya que son capaces de generar una gran variedad de mediadores que conducen a la inflamación tisular. Otras células involucradas son los linfocitos, macrófagos y células epiteliales a través de interacciones célula-célula, pero las más importantes son las células T CD4⁺ especialmente las T_H2 ^(13, 15, 16).

La inflamación asmática se atribuye a una sensibilidad anormal a distintos componentes que desencadenan una respuesta celular con un incremento de mediadores inflamatorios (citocinas tipo T_{H2})^(9, 13, 14, 15, 16).

Esta intervención de las citocinas T_{H2}, en la patología del asma, se debe a que tienen la capacidad para promover la maduración y activación de mastocitos, generar la síntesis de IgE por los linfocitos B y a originar la infiltración de eosinófilos que conducen al daño epitelial y a la hiperreactividad bronquial (en adelante HRB), con la sucesiva producción de moco y

Tabla 1. Clasificación de citocinas según el origen de su respuesta.

Citocinas	
Tipo T_{H1}	Tipo T_{H2}
TNF- α	IL-4
IFN- α	IL-5
IL-2	IL-6
IL-12	IL-9
	IL-10
	IL-13

contracción del músculo liso. Sin embargo, esta relación entre la activación de células T y el patrón inflamatorio del asma aún no ha sido del todo comprendida, pero existe evidencia experimental que implica a las células T_{H2} en la patogénesis del asma^(9, 13, 16).

En la respuesta inflamatoria del asma, la especificidad antigénica de la IgE propicia que los mastocitos liberen diversos mediadores proinflamatorios como histamina, leucotrienos, proteasas y prostaglandinas, los cuales amplifican la respuesta produciendo daño tisular local y atracción de otras células inflamatorias. Esta inflamación va a provocar las alteraciones en las vías respiratorias que suceden en la enfermedad (9, 15).

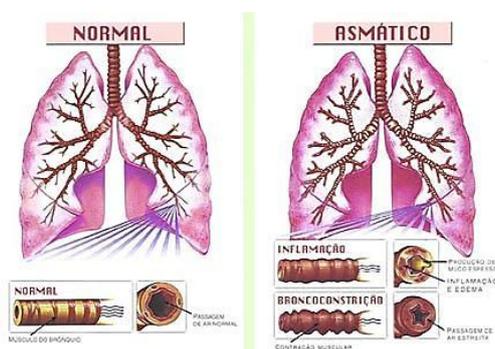


Figura 5. Respuesta inflamatoria en el asma. Broncoconstricción.

La regulación de la producción de IgE involucra interacción con células presentadoras de antígeno (APC) y linfocitos T, así como la secreción de citocinas que magnifican la respuesta inmune. La producción de IL-4 por las células T_H2 estimula la producción de IgE en las células B, la IL-5 estimula la diferenciación y movilización de eosinófilos a los sitios de inflamación (9). La IL-10 aumenta el crecimiento y diferenciación de mastocitos e inhibe la producción de IFN- α . La histamina liberada por los mastocitos estimula la constricción bronquial y la producción excesiva de moco (13).

En los pacientes que sufren EREA se ha observado que tienen un mayor número de eosinófilos, mastocitos, linfocitos T y macrófagos con respecto a sujetos normales (3, 7).

2.8- Desarrollo de la EREA

La EREA se presenta como una enfermedad evolutiva, con un patrón característico en la aparición de síntomas. El cuadro clínico se inicia generalmente entre los treinta y cuarenta años de edad. Entre sus síntomas iniciales destaca la presencia de rinitis persistente; estos síntomas pueden aparecer después de que la persona ha sufrido una infección viral⁽¹⁴⁾.

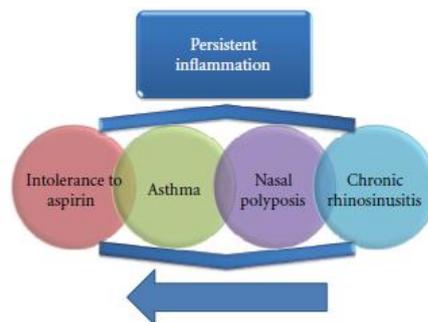


Figura 6. Historia natural de la Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina (EREA).

Posteriormente, alrededor de dos años después de haberse iniciado la rinitis, aparecen los primeros pólipos nasales; el desarrollo del asma puede ocurrir dentro de tres meses a cinco años después de iniciada la rinitis y por último los síntomas respiratorios que son inducidos por la ingesta de aspirina puede aparecer a lo largo de todo el curso de la enfermedad⁽¹⁴⁾.

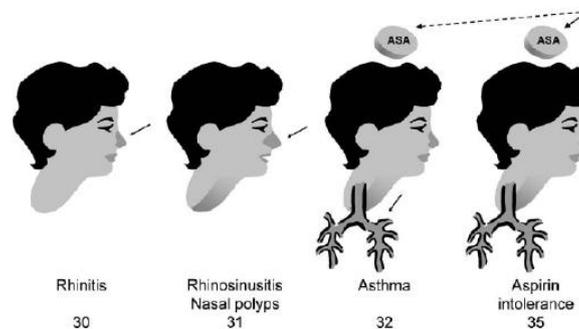


Figura 7. Desarrollo de la EREA

A diferencia de asma, la EREA se presenta entre los 29 y 34 años, iniciándose en las mujeres a una edad más temprana con respecto a los hombres ⁽²⁾.

2.8.1- Mecanismo de patogénesis de la EREA

En la EREA un mecanismo con intervención de IgE no explica la enfermedad ⁽²⁾, ya que no han sido detectados anticuerpos contra la aspirina o algunos otros AINES ^(7, 14). El mecanismo de patogénesis aún no ha sido identificado, sin embargo, desde que en el año de 1971 Vane describió el mecanismo de acción de la aspirina ⁽¹⁷⁾, esto contribuyó al desarrollo de una teoría en la que se trata de explicar que las reacciones ocasionadas por la intolerancia a la aspirina no eran debidas a una reacción alérgica sino ocasionadas por modificaciones en el mecanismo de inhibición de la enzima COX-1, es decir en el metabolismo del Ácido Araquidónico ⁽¹⁴⁾.

Los sujetos con esta enfermedad no sólo presentan intolerancia a la aspirina, sino también a una amplia gama de analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) que inhiben preferencialmente a la COX-1, tales como el piroxicam, indometacina, ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, ketorolaco y diclofenaco por mencionar solo algunos; esta reacción también puede presentarse con inhibidores débiles de la COX-1 tales como el salsalato y el acetaminofén, aunque en altas dosis ^(3, 6).

La reacción de intolerancia puede presentarse también con inhibidores parcialmente selectivos a la COX-2, tales como el meloxicam y la nimesulida en bajas concentraciones, pero que, sin embargo pueden inhibir a la COX-1 en altas concentraciones terapéuticas (p. ej. 15 mg de meloxicam) ^(3, 49, 50, 51).

Aunque de manera inusual, también es posible que la reacción de intolerancia se presente mediante el empleo de inhibidores selectivos de la COX-2, tales como el rofecoxib, celecoxib, valdecoxib, etoricoxib, parecoxib y lumiracoxib; sin embargo, los reportes de que esto ocurra con el empleo de estos agentes terapéuticos son escasos ⁽³⁾. Lo anterior se encuentra a manera de resumen en la tabla 2.

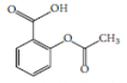
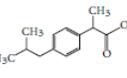
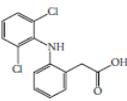
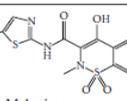
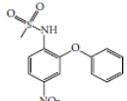
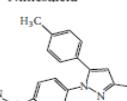
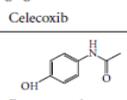
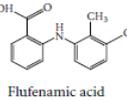
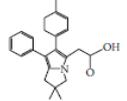
La EREA es una enfermedad inflamatoria caracterizada por la hipertrofia del músculo liso bronquial, secreciones excesivas de moco e inflamación, proceso en el cual participan diferentes tipos de células activadas como son los mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, basófilos y linfocitos; los pacientes con esta patología presentan un estado de inflamación continua de vías respiratorias altas y bajas y la exposición a la aspirina acentúa al proceso inflamatorio y conduce a las exacerbaciones del asma ⁽¹⁾.

Los procesos asmáticos que desarrollan este tipo de enfermos presentan predominantemente una respuesta tipo T_H2, en la cual tanto el equilibrio de subpoblaciones de linfocitos T cooperadores, como el de citocinas proinflamatorias (incluidas las quimiocinas) y antiinflamatorias es vital para el control de la respuesta inflamatoria; la desregulación en este mecanismo, conduce al desarrollo de condiciones patológicas tales como autoinmunidad e inflamación crónica ^(6, 7).

Es interesante destacar que en la EREA, se han observado niveles incrementados de citocinas proinflamatorias secretadas por células epiteliales y linfocitos T_H2 activados, entre las que se encuentran IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF y eotaxina ⁽³⁾.

Una de las propuestas más aceptadas en la patogénesis de la EREA, es la que se refiere a un metabolismo anormal del ácido araquidónico, como se revisaremos a continuación.

Tabla 2. Clasificación de los AINEs, mecanismo de acción y estructuras representativas; COX: ciclooxigenasa; 5-LO: 5-Lipooxigenasa.

Chemical class	Example	Inhibitory action	Representative example
Salicylates	Acetylsalicylic acid (Aspirin), diflunisal, mesalamine, salsalate	Nonselective; COX-1, COX-2,	 Acetylsalicylic acid
Propionic acid derivatives	Fenoprofen, flurbiprofen, ibuprofen, ketoprofen, naproxen, oxaprozin	Nonselective, COX-1, COX-2	 Ibuprofen
Acetic acid derivatives	Diclofenac, etodolac, indomethacin, ketorolac, nabumetone sulindac	Nonselective, COX-1, COX-2	 Diclofenac
Enolic acid (oxicam) derivatives	Droxicam, isoxicam, meloxicam, piroxicam, tenoxicam	Nonselective, preferential COX-2	 Meloxicam
Sulphonanilides	Nimesulide	Nonselective, preferential COX-2	 Nimesulide
Selective COX-2 inhibitors (coxibs)	Celecoxib, parecoxib, etoricoxib	COX-2	 Celecoxib
p-amino phenol derivatives	Paracetamol, phenacetin	COX	 Paracetamol
Fenamic acid derivatives (fenamates)	Acid, flufenamic acid, meclofenamic acid, mefenamic acid	COX	 Flufenamic acid
Others	Licofelone	COX, 5-LO	 Licofelone

2.8.2.- Metabolismo del ácido Araquidónico (AA).

El ácido araquidónico (en adelante AA) es un ácido graso esencial que se encuentra esterificado en los fosfolípidos de la membrana plasmática celular de eosinófilos y mastocitos. Existen dos vías de metabolización del AA, la vía de la COX y la vía de la LOX, las cuales dan origen a distintos eicosanoides ⁽³⁰⁾.

La enzima COX existe en dos isoformas, la COX-1, que se expresa de manera constitutiva, y la COX-2 la cual es inducible en condiciones inflamatorias, previamente ya descrito (5, 30).

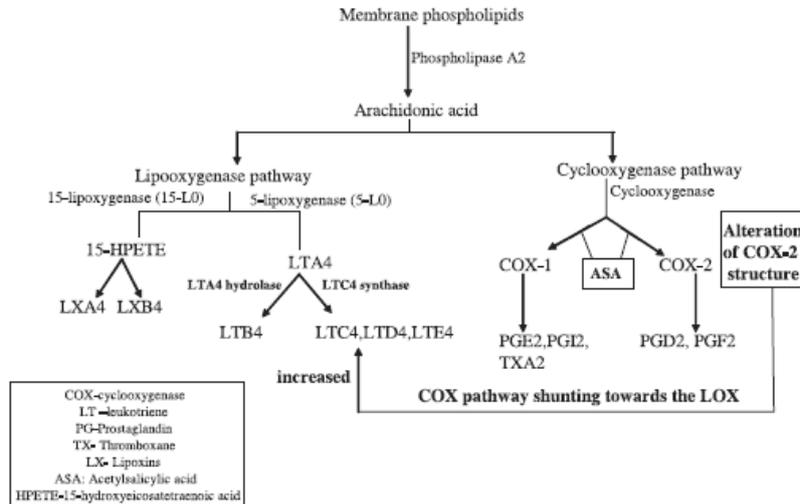


Figura 8. Metabolismo del ácido araquidónico y modificaciones causadas por la aspirina.

Bajo condiciones fisiológicas normales los metabolitos producidos por la vía de la COX son PGE₂, la cual cumple una importante función al inhibir la liberación de cisteinil Leucotrienos (en adelante cys-L), así como la broncoconstricción, la PGI₂ y tromboxanos (30). En condiciones inflamatorias se produce PGD₂, la cual produce vasodilatación, broncoconstricción y es un potente atrayente para los eosinófilos (6, 7).

La aspirina al inhibir la vía de la COX, obliga a que el metabolismo del AA se lleve a cabo por la vía de la LOX, en donde se producen leucotrienos, como LTA₄, el cual puede ser hidrolizado, y convertirse en LTB₄, el cual tienen la función de atraer y activar a los neutrófilos. Por otro lado el LTA₄, por medio de la enzima LTC₄ sintasa, también puede ser convertido en cys-L como LTC₄, LTD₄ y LTE₄. Estos cys-L aumentan la permeabilidad vascular, favorecen la exudación del plasma y formación de edema, atraen eosinófilos, estimulan la

hiperproducción de moco por células bronquiales y estimulan la broncoconstricción (3, 4).

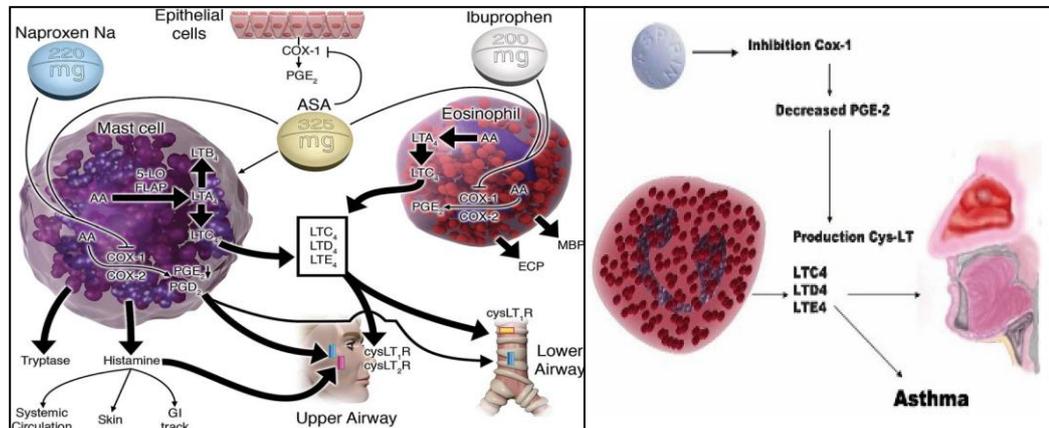


Figura 9. Inducción de reacciones respiratorias por aspirina y otros AINES por alteración en el metabolismo de AA.

Estudios demuestran que en los pacientes con EREA y los asmáticos que son tolerantes a la aspirina presentan niveles basales de cys-L elevados, en comparación con los sujetos sanos, y que luego de un estímulo bronquial con aspirina, los pacientes intolerantes muestran un número aún mayor de cys-L (1).

2.8.3- Prevalencia de la EREA

Se ha descrito que la prevalencia de la EREA en la población general adulta es de 0.6 % y 2.5%, de éste porcentaje en la población de personas que padecen asma la prevalencia de la EREA es de 11% y 23%. Esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia en mujeres que en hombres con una relación de 2:5. De la población que padece EREA, el 50% de las personas presentan un asma crónico, severo y dependen de corticoesteroides para el control de su enfermedad; el 30% tienen un asma moderada que pueden controlar con el uso

de esteroides inhalados; el 20% de la población con EREA sufren un asma leve e intermitente ⁽⁵⁾.

2.9-. Diagnóstico de la EREA

En la actualidad no existe una prueba de laboratorio para confirmar el diagnóstico de EREA, así que cuando existe sospecha clínica de esta enfermedad el paciente debe ser sometido a pruebas de provocación con aspirina para realizar el diagnóstico certero de la enfermedad ^(10, 18).

Estas pruebas de provocación consisten en administrar al paciente dosis crecientes de aspirina y observar si se produce una reacción, evaluando la presencia de síntomas en relación con la ingesta del medicamento. Las cuatro vías de provocación con aspirina pueden ser: oral, bronquial, nasal y endovenosa ^(18, 19).

El reto oral es considerado el estándar de oro, y se practica principalmente en Estados Unidos. Por otra parte el reto con inhalación bronquial con aspirina es utilizado principalmente en Europa ⁽³⁾. Sin embargo, lo más empleado es el reto nasal con aspirina ya que es simple, seguro y el más inocuo de todos, pues raramente induce broncoespasmo ⁽¹⁾.

El reto nasal, se realiza de manera habitual instilando 25 mg de lisil aspirina (L-ASA) en cada narina ⁽²⁰⁾; esta forma de retar con el agente desencadenante se ha implementado debido a que se ha observado que, los pacientes con EREA, no experimentan ataques de asma durante el mismo y sólo presentan síntomas a nivel local tales como rinorrea, congestión nasal y

estornudos⁽¹⁹⁾. La ventaja de este tipo de reto, radica en que el mismo no produce broncoespasmo en aquellos pacientes intolerantes a la aspirina y puede ser empleado incluso en aquéllos que presentan obstrucción bronquial. Sin embargo, una de sus principales desventajas, radica en el hecho de que la sensibilidad se ve disminuida considerablemente en comparación con el reto oral y a el hecho de que, en algunos pacientes la oclusión por pólipos nasales interfiere con el flujo nasal haciendo demasiado complicado la realización del reto^(3, 7).

El siguiente cuadro puede ejemplificarnos mejor las diferencias en sensibilidad y especificidad entre los diferentes retos:

TIPO DE RETO	SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD(%)
Oral	89	93
Inhalado	77	93
Intranasal	80	92,5

Con respecto a las sospechas clínicas que se deben tomar en cuenta para el diagnóstico de la EREA son^(4, 7):

- a) Una historia de exacerbación de asma después de la ingestión de aspirina u otro AINE.
- b) Congestión nasal crónica y rinorrea acuosa, especialmente si se realizan pruebas específicas de IgE y son negativas.

- c) Opacificación total o casi total de las cavidades nasales demostrada por tomografía computarizada.
- d) Un individuo que haya sufrido un rápido comienzo de un ataque severo de asma, sin haber presentado síntomas anteriormente, y que necesite atención urgente y admisión en la unidad de cuidados intensivos o bien que requiera intubación endotraqueal.

2.10-. Quimiocinas

El término quimiocina fue usado por primera vez en 1992 ⁽²¹⁾ para describir a un grupo de citocinas quimiotácticas que tienen la capacidad de unir la heparina con alta afinidad; direccionan el movimiento de los leucocitos circulantes hacia los sitios de inflamación o lesión, por lo cual son consideradas citocinas proinflamatorias, por lo que inicialmente los estudios se centraban en su papel en la inflamación ⁽²²⁾. Ahora, se conoce que desempeñan también un rol fundamental en direccionar el movimiento de las células mononucleares por todo el organismo, generando una respuesta inmune adaptativa, y contribuyendo a la patogénesis de una variedad de enfermedades ⁽²³⁾.

Actualmente, en humanos se conocen alrededor de 50 quimiocinas, las que están agrupadas en cuatro subfamilias (CCL, CXCL, CX3CL, XC o CL) en base a sus diferencias estructurales (secuencias de aminoácidos) y fisiológicas^(21, 22, 24). La característica bioquímica común de estas moléculas es la conservación generalmente de dos o tres pares de residuos de cisteína que se unen formando dos puentes disulfuro, esenciales para la actividad de la molécula ^(21, 25).

Las quimiocinas CCL (o β -quimiocinas) tienen dos cisteínas adyacentes, cerca de su extremo amino terminal. En mamíferos, se conocen al menos 27 miembros distintos dentro de este subgrupo. Las quimiocinas de esta subfamilia contienen normalmente seis cisteínas (C6-CC quimiocinas). Las quimiocinas CCL inducen la migración de monocitos y otros tipos celulares tales como células NK y células dendríticas ⁽²⁶⁾.

En las quimiocinas CXCL las dos cisteínas N terminales de CXC (o α -quimiocinas) están separadas por un aminoácido, representado en este nombre con una X. Se han descubierto 17 quimiocinas CXCL en mamíferos, que se subdividen en dos categorías: aquellas con una secuencia específica de aminoácidos (o motivo) de ácido glutámico-leucina-arginina (ELR) inmediatamente antes de la primera cisteína del motivo CXCL (ELR-positivo), y los que no tienen un motivo ELR (ELR-negativo). Las quimiocinas CXCL ELR-positivas inducen específicamente la migración de neutrófilos, e interactúan con los receptores de quimiocina CXCR1 y CXCR2.

Un ejemplo de quimiocina CXC ELR-positiva es la interleucina-8 o CXCL8, la cual induce a los neutrófilos a viajar por el torrente sanguíneo y entrar al tejido circundante. Otras quimiocinas CXC que no tienen el motivo ELR, como la CXCL13, tienden a ser quimioatrayentes para los linfocitos. Las quimiocinas CXCL se unen a los receptores de quimiocina CXC, de los cuales han sido descubiertos siete, y se designan CXCR1-7 ^(24, 25, 26, 27).

Es así que, recientemente se han identificado nuevas quimiocinas con características funcionales diferentes. Algunas de ellas son altamente

específicas para linfocitos y células dendríticas y se expresan constitutivamente en órganos linfoides primarios y secundarios. El hallazgo de estas nuevas quimiocinas que tienen como diana células pertenecientes al sistema inmune ha atraído el interés sobre estas moléculas y ha propiciado una nueva clasificación, principalmente en base a criterios funcionales.

De acuerdo con esta nueva clasificación se denominan quimiocinas inflamatorias a las clásicas con capacidad atrayente sobre monocitos y neutrófilos, mientras que las que actúan sobre linfocitos reciben el nombre de inmunoquimiocinas. . Ambos tipos pueden tener una estructura molecular CXC, si bien las inflamatorias clásicas poseen el motivo ELR (ácido glutámico-leucina-arginina) inmediatamente antes del primer residuo de cisteína, mientras que las inmunoquimiocinas no lo poseen (CXC no ELR).

De forma similar también se han descrito dentro de las quimiocinas CC moléculas inflamatorias clásicas e inmunoquimiocinas. Estas moléculas ejercen su función uniéndose a receptores celulares que, a diferencia de la citocinas, no son específicos para cada molécula, pudiendo el mismo receptor unir diferentes quimiocinas.

Tabla 3. Clasificación de quimiocinas y su receptores.

CXC Chemokine/Receptor Family				
Systematic Name	Human Chromosome	Human Ligand	Mouse Ligand	Chemokine Receptor(s)
CXCL1	4q12-q13	GRO α /MGS α - α	GRO/KC?	CXCR2 > CXCR1
CXCL2	4q12-q13	GRO β /MGS α - β	GRO/KC?	CXCR2
CXCL3	4q12-q13	GRO γ /MGS α - γ	GRO/KC?	CXCR2
CXCL4	4q12-q13	PF4	PF4	Unknown
CXCL5	4q12-q13	ENA-78	LIX?	CXCR2
CXCL6	4q12-q13	GCP-2	CK α -3	CXCR1, CXCR2
CXCL7	4q12-q13	NAP-2	Unknown	CXCR2
CXCL8	4q12-q13	IL-8	Unknown	CXCR1, CXCR2
CXCL9	4q21.21	Mig	Mig	CXCR3
CXCL10	4q21.21	IP-10	IP-10	CXCR3
CXCL11	4q21.21	I-TAC	Unknown	CXCR3
CXCL12	10q11.1	SDF-1 α / β	SDF-1	CXCR4
CXCL13	4q21	BLC/BCA-1	BLC/BCA-1	CXCR5
CXCL14	Unknown	BRAK/bolekine	BRAK	Unknown
(CXCL15)	Unknown	Unknown	Lungkine	Unknown
C Chemokine/Receptor Family				
Systematic Name	Human Chromosome	Human Ligand	Mouse Ligand	Chemokine Receptor(s)
XCL1	1q23	Lymphotactin/SCM-1 α /ATAC	Lymphotactin	XCR1
XCL2	1q23	SCM-1 β	Unknown	XCR1
CX ₃ C Chemokine/Receptor Family				
Systematic Name	Human Chromosome	Human Ligand	Mouse Ligand	Chemokine Receptor(s)
CX3CL1	16q13	Fractalkine	Neurotactin	CX3CR1
CC Chemokine/Receptor Family				
Systematic Name	Human Chromosome	Human Ligand	Mouse Ligand	Chemokine Receptor(s)
CCL1	17q11.2	I-309	TCA-3, P500	CCR8
CCL2	17q11.2	MCP-1/MCAF	JE?	CCR2
CCL3	17q11.2	MIP-1 α /LD78 α	MIP-1 α	CCR1, CCR5
CCL4	17q11.2	MIP-1 β	MIP-1 β	CCR5
CCL5	17q11.2	RANTES	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
(CCL6)	Unknown	Unknown	C10, MRP-1	Unknown
CCL7	17q11.2	MCP-3	MARC?	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	17q11.2	MCP-2	MCP-2?	CCR3
(CCL9/10)	Unknown	Unknown	MRP-2, CCF18 MIP-1 γ	Unknown
CCL11	17q11.2	Eotaxin	Eotaxin	CCR3
(CCL12)	Unknown	Unknown	MCP-5	CCR2
CCL13	17q11.2	MCP-4	Unknown	CCR2, CCR3
CCL14	17q11.2	HCC-1	Unknown	CCR1
CCL15	17q11.2	HCC-2/Lkn-1/MIP-1 δ	Unknown	CCR1, CCR3
CCL16	17q11.2	HCC-4/LEC	LCC-1	CCR1
CCL17	16q13	TARC	TARC	CCR4
CCL18	17q11.2	DC-CK1/PARC AMAC-1	Unknown	Unknown
CCL19	9p13	MIP-3 β /ELC/exodus-3	MIP-3 β /ELC/exodus-3	CCR7
CCL20	2q33-q37	MIP-3 α /LARC/exodus-1	MIP-3 α /LARC/exodus-1	CCR6
CCL21	9p13	6CKine/SLC/exodus-2	6CKine/SLC/exodus-2/TCA-4	CCR7
CCL22	16q13	MDC/STCP-1	ABCD-1	CCR4
CCL23	17q11.2	MPIF-1	Unknown	CCR1
CCL24	7q11.23	MPIF-2/Eotaxin-2	Unknown	CCR3
CCL25	19p13.2	TECK	TECK	CCR9
CCL26	7q11.23	Eotaxin-3	Unknown	CCR3
CCL27	9p13	CTACK/ILC	ALP/CTACK/ILC ESKine	CCR10*

Todas estas moléculas se encuentran distribuidas en el genoma en clusters, mayoritariamente en el cromosoma 4 y 17, lo que indica un origen génico común y su diversidad por duplicaciones génicas ^(26, 27).

Las quimiocinas XC o CL es el tercer grupo de quimiocinas (o quimiocinas γ), y es distinto de todas las demás quimiocinas en que sólo presentan dos cisteínas. Se han descubierto dos quimiocinas que pertenecen este subgrupo, y se llaman XCL1 y XCL2. Estas quimiocinas atraen a los precursores de las células T al timo ^(26, 27).

Existe un cuarto grupo de quimiocinas, el grupo CX₃CL, cuyos miembros presentan tres aminoácidos entre las dos cisteínas. La única que se ha descubierto hasta ahora ha sido la fractalquina (o CX₃CL1). Es a la vez secretada y anclada a la superficie de la célula que lo expresa, por lo que sirve tanto como un quimioatrayente como una molécula de adhesión ^(24, 28).

Las quimiocinas son multifuncionales, pues regulan no solo la quimiotaxis, sino también la adhesión, degranulación, angiogénesis, desarrollo de células hematopoyéticas e inmunes, así como la génesis de órganos linfoides ⁽²¹⁾. Sin embargo, la mayoría tienen poco o ningún efecto sobre la proliferación celular⁽²³⁾.

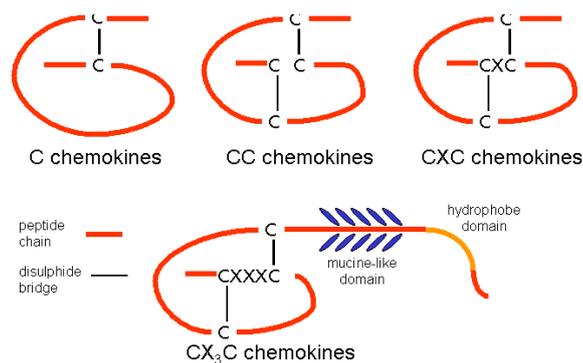


Figura 10. Representación esquemática de las diversas familias de quimiocinas.

Además de sus roles en la fisiología normal y defensa del huésped, también están implicados en algunas enfermedades autoinmunes e inflamatorias, entre ellas: esclerosis múltiple, artritis reumatoide, asma, y rechazo al trasplante de órganos ⁽²⁵⁾. Además de ello, algunos patógenos comunes mimetizan o inhiben funciones de las quimiocinas, para su propio beneficio o usan a sus receptores como medio de unión para invadir las células ^(21, 24).

2.10.1.- Quimiocinas en enfermedades inflamatorias.

Las enfermedades inflamatorias se caracterizan por una acumulación selectiva de subgrupos de leucocitos, y por la expresión controlada de ciertas quimiocinas ⁽²⁹⁾. Cada enfermedad tiene un infiltrado inflamatorio característico, en el cual la presencia de las quimiocinas pueden ser reguladas adecuadamente ^(27, 29).

En asma, la submucosa de las vías aéreas es infiltrada por células mononucleares, eosinófilos y mastocitos principalmente, causando hiperplasia de las glándulas secretoras de moco y fibrosis subepitelial. Modelos animales de inflamación de las vías respiratorias alérgicas y pacientes asmáticos, revelan el papel clave de las quimiocinas en la inflamación del pulmón ⁽³¹⁾.

El asma es una compleja enfermedad inmunológica e inflamatoria caracterizada por inflamación de las vías respiratorias, remodelación del epitelio pulmonar e hiperreactividad bronquial. La respuesta inflamatoria característica comprende la activación de linfocitos T_{H2}, eosinófilos y mastocitos activados ^(29, 31).

2.10.2.- Quimiocina CCL2

Quimiocina (motivo C-C) ligando 2, es también conocida como proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1); CCL2 es una pequeña citocina perteneciente a la familia CCL de quimiocinas. CCL2 recluta monocitos, células T de memoria, y las células dendríticas a los sitios de la inflamación producida por daño tisular o infección. Se encuentra codificada en el brazo q del cromosoma 17 en la posición 17q11.2-q21.1 ^(25, 26, 32).

El tamaño del gen comprende una longitud de 1927 bases; posee tres exones y dos intrones. El precursor de la proteína contiene un péptido-señal de 23 aminoácidos. A su vez, la quimiocina CCL2 madura tiene una longitud de 76 aminoácidos, cuyo peso molecular es de aproximadamente 13 kilodaltons (kDa) ⁽³²⁾.

CCL2 se encuentra anclada en la membrana plasmática de las células endoteliales por las cadenas laterales de glicosaminoglicano de los proteoglicanos.

CCL2 es secretada principalmente por monocitos, macrófagos y células dendríticas. El factor de crecimiento derivado de plaquetas es un importante inductor del gen de CCL2. Para convertirse en proteína activa, CCL2 tiene que ser escindido por la metaloproteinasa MMP-12. El CCR2 y CCR4 son receptores de superficie celular a los que se une CCL2 ^(27, 32).

CCL2 exhibe una actividad quimiotáctica para los monocitos y basófilos. Sin embargo, no atrae neutrófilos o eosinófilos. Después de la eliminación del residuo N-terminal, CCL2 pierde su actividad quimiotáctica para los basófilos y se convierte en un quimioatrayente de eosinófilos. Los basófilos y los mastocitos que son tratados con CCL2 liberan sus gránulos al espacio intercelular ⁽²⁸⁾.

CCL2 se ha implicado en la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias caracterizadas por infiltración de monocitos, tales como el asma, la psoriasis, la artritis reumatoide y la aterosclerosis ⁽²²⁾.

2.10.3-. Quimiocina CCL8

Quimiocina (motivo C-C) ligando 8, es también conocida como proteína quimiotáctica de monocitos 2 (MCP-2); CCL8 es una pequeña citocina perteneciente a la familia CCL de quimiocinas ^(22, 25, 26). La quimiocina CCL8 activa y es quimiotáctico para diferentes células inmunes, incluyendo los mastocitos, eosinófilos y basófilos, (que están implicadas en respuesta alérgica), y los monocitos, células T y células NK implicadas en la respuesta inflamatoria. Se encuentra codificada también en el brazo q del cromosoma 17 en la posición 17q11.2 ^(25, 27, 32).

La proteína CCL8 se produce como un precursor que contiene 109 aminoácidos, que se escinde para producir CCL8 maduro que contiene 75 aminoácidos. CCL8 ejerce su acción mediante la unión a varios receptores de la superficie celular (receptores de quimiocinas). Estos receptores incluyen CCR1, CCR2B y CCR5 ⁽²⁷⁾.

Debido a su acción de reclutamiento de leucocitos a los sitios de inflamación, es probable que esta quimiocina contribuya a la infiltración de leucocitos asociada a los procesos tumorales y al estado antiviral de la infección por el virus del VIH, esto debido a su alta afinidad de unión al receptor CCR5, uno de los co-receptores principales para VIH-1 ^(27, 32).

2.10.4-. Quimiocina CXCL2

Quimiocina (motivo CXC) ligando 2; también se le denomina proteína inflamatoria de macrófagos 2-alfa (MIP2- α), proteína reguladora del crecimiento beta (Gro- β) y Gro-oncogén 2 (Gro-2). CXCL2 es una citocina

pequeña perteneciente a la familia de quimiocinas CXCL⁽²²⁾. Esta quimiocina es secretada por monocitos y macrófagos y es quimiotáctica para leucocitos polimorfonucleares y células madre hematopoyéticas. CXCL2 se encuentra codificada en el brazo q del cromosoma 4 en la posición 4q21, región en la que se encuentra un cluster de quimiocinas CXCL^(27, 28, 32).

CXCL2 moviliza las células mediante la interacción con receptores de la superficie celular de quimiocinas llamado CXCR2⁽²⁷⁾.

2.11-. EREA y quimiocinas

Una característica distintiva de las enfermedades alérgicas de las vías respiratorias es la acumulación de eosinófilos, neutrófilos, linfocitos y macrófagos en el pulmón. Dentro de la mucosa respiratoria, linfocitos CD4⁺ del tipo Th2 (células Th2) y otros leucocitos, liberaran una serie de mediadores inflamatorios que contribuyen de manera directa e indirecta a la remodelación de la pared de vía respiratoria, la hipersecreción de moco, obstrucción de las vías respiratorias, y la hiperreactividad bronquial^(45, 46, 47). Como ya hemos revisado, las quimiocinas, son una gran familia de citocinas quimiotácticas que orquestan la migración y activación de poblaciones de leucocitos en virtud de mantener la homeóstasis así como y responder a condiciones inflamatorias⁽²⁴⁻²⁷⁾.

Aunque algunos estudios se han encargado de tratar de poner de manifiesto el papel crucial de las quimiocinas en el desarrollo y control de múltiples aspectos de la intolerancia a la aspirina, el amplio espectro de quimiocinas involucradas en la inflamación alérgica de las vías respiratorias, el

papel concreto que juegan en la misma, así como las diferentes etapas en la evolución de la inflamación pulmonar y la manera en que las quimiocinas regulan este fenómeno *in vivo* solamente han sido parcialmente comprendidos.

Diversos estudios se han enfocado en el estudio del papel de las quimiocinas y su participación en la patogénesis de la EREA; algunos de estos estudios, por ejemplo, el de Lezcano Meza, et al.⁽³³⁾, sugieren que, de manera particular citocinas del tipo T_H2, como la IL-4 se encuentran directamente involucradas en la generación de los síntomas de la EREA como la rinosinusitis crónica además de estimular la producción de quimiocinas de la familia CCL, como por ejemplo eotaxina-2/CCL24⁽³³⁾. Pods et al. también sugieren lo mismo al reportar un incremento de la expresión de quimiocinas de la familia CCL tales como eotaxina (CCL11) y eotaxina-2 (CCL24) en pólipos nasales de pacientes con EREA⁽³⁴⁾, que son asociados de manera directa con el origen de los síntomas de dicha intolerancia, aunque el mecanismo por el cual esta es desarrollada, no ha sido elucidado.

Otros estudios, como el de Kupczyk et al.⁽³⁵⁾, mediante el empleo de lavados nasales demuestran que, en pacientes asmáticos intolerantes a la aspirina se observan incrementados los niveles de quimiocinas de la familia CCL, en particular de CCL5(RANTES) después de retos nasales con L-ASA, así como también lo indica el estudio hecho en nuestro laboratorio por Fuentes Beltrán et al., que demuestran niveles incrementados de la misma quimiocina también en lavados nasales de pacientes intolerantes a la aspirina⁽³⁸⁾ retados con lisil-aspirina. Existen también estudios que documentan de manera

detallada y minuciosa la liberación de esta quimiocina por parte de pólipos nasales ^(36, 37) de pacientes con EREA.

Diversas células del sistema inmune que participan en los procesos inflamatorios y que se infiltran, como los eosinófilos, son atraídos hacia el tejido en cuestión (quimiotaxis) por diversas quimiocinas; algunas de ellas como eotaxina (CCL11), eotaxina-2 (CCL24), eotaxina-3 (CCL26), RANTES (CCL5), MCP-3 (CCL7) y MCP-4(CCL13) que inducen la quimiotaxis de eosinófilos (nótese que todas ellas pertenecen a la familia de quimiocinas CCL) lo hacen de manera primaria a través del receptor de quimiocinas motivo C-C (o de la familia CCL), CCR3 ⁽⁴¹⁾. En general, las quimiocinas y sus receptores se encargan de coordinar el reclutamiento selectivo y activación de leucocitos adecuados para la respuesta inmune innata y adaptativa en los tejidos afectados por procesos inflamatorios ^(39, 44). Sin embargo, evidencias recientes indican que el efecto de las quimiocinas se extiende más allá de su capacidad para modular el tráfico celular, y se encuentran implicadas en acciones tales como remodelación de tejidos, angiogénesis y los procesos de reparación de daño tisular ^(40, 44). Por ejemplo el rico infiltrado de eosinófilos observado en las enfermedades inflamatorias es debido, en parte, a los efectos de agonistas del receptor CCR3 en eosinófilos, según lo reporta el estudio de Stellato y cols. ⁽⁴¹⁾, en biopsias de células epiteliales de pacientes con asma y otras enfermedades respiratorias; uno de los puntos a destacar en este ejemplo y que interesan a nuestro estudio, es el concerniente a la evidencia que muestra la asociación directa en la modulación de la expresión de receptores de quimiocinas (en el ejemplo citado CCR3), por parte de quimiocinas de la familia CCL, cruciales y

fundamentales en la infiltración de células del sistema inmune en los tejidos afectados y que son responsables de manera directa de la inflamación y remodelación del epitelio respiratorio, lo que nos sugiere que el estudio del papel este tipo de citocinas inflamatorias es fundamental en el conocimiento, la elucidación aunque sea de manera parcial de la patogénesis, desarrollo y tratamiento de la EREA.

Siguiendo en la línea de la comprensión del papel de las quimiocinas en la patogénesis y desarrollo de la EREA, existen además, a manera de mención otros estudios que muestran el aumento significativo de la expresión del receptor de quimiocinas de la familia CCL, CCR3⁽⁴²⁾, en sujetos asmáticos intolerantes posterior a los retos con aspirina en comparación con sujetos sanos^(43, 44). Existe también evidencia de que el polimorfismo (-520 T/G) en el gen CCR3 se encuentra directamente asociado con alteraciones en la expresión del gen y exacerba los síntomas de la intolerancia a la aspirina después del reto con la misma⁽⁴³⁾, y por tanto directamente implicado en el efecto y expresión de quimiocinas.

La angiogénesis es un componente fundamental de la inflamación y de la reparación tisular; este fenómeno en enfermedades inflamatorias pulmonares, se encuentra estrechamente relacionado con la sobreexpresión de quimiocinas de la familia CXCL ELR+⁽⁵²⁾, tal como lo es, en el caso de nuestro estudio, la quimiocina CXCL2. Una de las características que contribuyen a las complicaciones de la intolerancia a la Aspirina es la fibrosis pulmonar a la que, va aunada el fenómeno de angiogénesis; y las quimiocinas de esta familia con la característica mencionada, se encuentran altamente

implicadas en ello ⁽⁵³⁾. Modelos murinos han puesto de manifiesto, como el imbalance en la expresión de quimiocinas de la familia CXCL (particularmente MIP-2/CXCL2), contribuyen de manera importante en la patogénesis de la angiogénesis y la fibrosis pulmonar ^(54, 55).

3-. JUSTIFICACIÓN

Si bien existen diversos estudios sobre la EREA, poco se sabe sobre los mecanismos biológicos y moleculares implicados que subyacen en dicha enfermedad y en la génesis de la intolerancia a la Aspirina. Hasta el día de hoy, el argumento más ampliamente aceptado es el que propone la alteración en el metabolismo del ácido araquidónico; sin embargo éste mecanismo no nos aclara completamente las consecuencias fatales que presentan los pacientes con EREA y menos aún, la respuesta aguda fatal que presentan dichos pacientes después de enfrentarlos con el o los agentes desencadenantes de la EREA.

Es muy claro que primordialmente se presenta una respuesta exacerbada de tipo inflamatorio, aunque poco se sabe acerca de la respuesta inmune y los procesos moleculares que subyacen tras ésta enfermedad.

Es por ello que se hizo imprescindible hacer un estudio más complejo y completo con tecnología de vanguardia, como lo son los Microarreglos de expresión génica. En breve, se realizó esta técnica de biología molecular en biopsias bronquiales en pacientes con EREA, antes y después de retarlos con Lisil aspirina, (en adelante L-ASA , sal del ácido acetil salicílico). Paralelamente se manejo un grupo de comparación de sujetos asmáticos tolerantes a la aspirina (ATA) y un grupo control de sanos (CS) o no asmáticos (NA). Esto con la finalidad de distinguir claramente los genes específicos, participantes en la respuesta a la aspirina. Cabe resaltar que, como era de esperarse por ésta tecnología se obtuvieron miles de genes de expresión para cada uno de los

grupos en estudio. Sin embargo después de hacer un análisis de expresión diferencial, donde solo se tomaban como significativos aquellos que tenían un nivel de expresión ± 2 veces que su grupo referencia y una $p \leq 0.05$, se lograron obtener los siguientes resultados:

- a) EREAr vs. EREAb: 44 genes sobre-expresados.
- b) ATAr vs. ATAb: 50 genes sobre-expresados.
- c) NAr vs. NAb: 47 genes sobre-expresados y 2 genes sub-expresados.

En este trabajo solo nos enfocamos en el estudio y análisis de los perfiles de expresión de 3 genes relacionados a quimiocinas (CCL2, CCL8 y CXCL2), que se encontraron más sobre-expresados en comparación al total encontrado, en el grupo de los EREA pos-reto con respecto a los EREA en estado basal. Y, como se menciona anteriormente éstas moléculas son altamente participativas en procesos de tipo inflamatorio y representativas de ser quimiotácticas y quimioatrayentes de monocitos y macrófagos primordialmente. Además de ser las principales poblaciones presentes a nivel pulmonar y cuyo reclutamiento se encuentra mediado por quimiocinas, consideramos altamente relevante evaluar los perfiles de expresión de las mismas.

4-. OBJETIVOS

4.1-. Objetivo general

Validar y analizar la expresión diferencial, de los genes CCL2, CCL8 y CXCL2, en las muestras de biopsia bronquiales antes y después del reto, en el grupo de EREA, Asmáticos Tolerantes (ATA) y controles no asmáticos (NA).

4.2-. Objetivos específicos

- Extraer, cuantificar y analizar el RNA total de cada una de las muestras de biopsia bronquial del grupo de estudio.
- Obtener el cDNA a partir del RNA total de cada una de las muestras de biopsia bronquial del total del grupo de estudio.
- Cuantificar por la tecnología de RT- PCR tiempo real, la expresión de los genes CCL2, CCL8 y CXCL2 en el total de las muestras del grupo de estudio.
- Analizar los resultados de expresión de los genes CCL2, CCL8 y CXCL2 en los pacientes con EREA, con respecto al grupo de asmáticos tolerantes a la aspirina (ATA) y a los controles no asmáticos (NA).
- Determinar si alguno de estos genes es, después del análisis, característico de la EREA, y por tanto, su probable implicación en la patofisiología de la misma.

5-. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1-. Grupos de estudio

Para este trabajo se incluyeron 3 grupos de estudio con 4 sujetos cada uno, los cuales se encuentran estructurados de la siguiente manera:

- 1) 4 Pacientes con Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina (EREA).
- 2) 4 Pacientes Asmáticos Tolerantes a la Aspirina (ATA).
- 3) 4 Sujetos control no asmáticos (NA).

A todos y cada uno de ellos se les hizo una broncoscopia, la cual consistía en tomarles 100 ml de lavado bronquioalveolar (LBA) y una biopsia bronquial antes y después de un reto con lisil aspirina "in situ", es decir directamente en el bronquio.

Los criterios de inclusión fueron: pacientes mexicanos con diagnóstico de EREA, ATA y sujetos voluntarios sanos sin síntomas respiratorios, sin historia de asma o intolerancia a la aspirina y sujetos con un volumen espiratorio forzado (FEV) mayor al 75%.

Los criterios de exclusión fueron: pacientes con alguna otra patología concomitante, pacientes que estuvieran tomando medicamentos que interfirieran con los resultados de nuestros estudios, y pacientes con un FEV inicial menor al 75%.

Para hacer un diagnóstico certero de cada uno de los pacientes y clasificarlos en el grupo correspondiente, previo a la broncoscopia se les hizo un reto nasal con L-ASA, como se describe a continuación.

5.2-. Reto nasal y broncoscopia.

Se realizó rinomanometría y espirometría basal a todos los pacientes. Se instiló 0,1 mL de solución salina 0.9% en cada narina y se realizó nuevamente rinomanometría para descartar hiperreactividad inespecífica. Una vez descartada la hiperreactividad inespecífica se realizó el lavado nasal correspondiente al pre reto nasal, con una sonda foley, instilando 5mL de solución salina 0.9% en cada narina. Después se instilaron 0.25mL de una solución de L-ASA en cada narina, correspondientes a 12.5mg de L-ASA, se realizó rinomanometría y espirometría 20 y 30 minutos posterior a la instilación. El reto se considerará positivo si se observa disminución del 40% del flujo inspiratorio nasal con respecto al basal y/o una caída del FEV1 en un 20%, si no es así se vuelve a instilar en cada narina la misma dosis. Se realiza nuevamente rinomanometría y espirometría 20 y 30 minutos posterior a la instilación y se realiza el lavado nasal con 5mL de solución salina 0.9% en cada narina, correspondiente al pos reto nasal. Una vez que los pacientes fueron diagnosticados como EREA, asmáticos, o no asmáticos, se procedió a tomar la biopsia bronquial por broncoscopia.

Las broncoscopias fueron realizadas por el médico especialista siguiendo las recomendaciones de la British Thoracic Society Guidelines⁽⁵⁶⁾, descrito brevemente a continuación. Previo a la broncoscopia, todos los

pacientes fueron administrados con oxígeno suplementario a la saturación de O₂; se monitorizó su frecuencia cardiaca por medio de oxámetro de pulso después de la administración de 0,5mg de atropina, 2,5mg de midazolam y anestesia tópica con lidocaína al 2-4%. Se realizó entonces un lavado bronquioalveolar (LBA) previo a la toma de la biopsia; entonces se procedió a tomar la primer biopsia bronquial antes del reto (pre-.reto), la cual fue colocada en un tubo de polipropileno de 5 mL estéril que contenía una solución del reactivo RNA later[®] Invitrogen #Cat 4427575, el cual rápidamente permeó todo el tejido obtenido, estabilizando y protegiendo el RNA mediante la inhibición de RNAsas. Posteriormente se realizó un reto bronquial empleando la décima parte de la concentración de L-aspirina empleada para el reto nasal⁽⁵⁷⁾; entonces se tomó un nuevo LBA y una nueva biopsia bronquial posterior a este reto (pos-reto), la cual también se colocó en un tubo con el reactivo RNA later[®]. Las biopsias bronquiales se tomaron del segmento medio del lóbulo derecho.

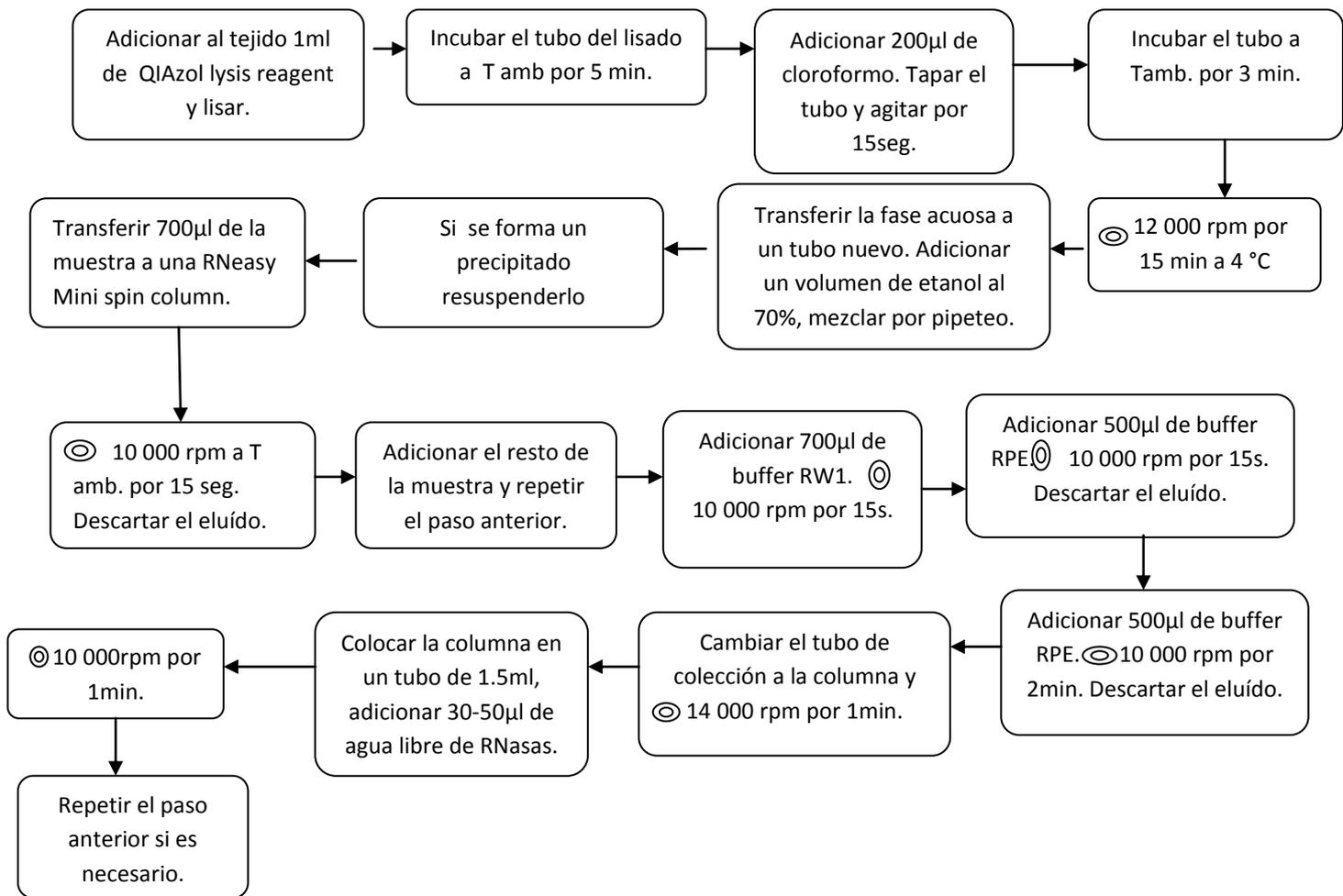
5.3-. Extracción de RNA total de Biopsias Bronquiales

Para realizar la extracción del RNA de las biopsias bronquiales, se tomaron las precauciones adecuadas para realizar dicho procedimiento, empleando material libre de RNAasas y manipulando los especímenes de la manera más rápida posible para evitar al máximo la degradación del RNA.

Dicha extracción se realizó empleando el kit comercial RNeasy[®] Microarray Tissue Mini Kit Cat. No. 73304 de la casa comercial Qiagen,

siguiendo la técnica habitual recomendada por la misma y cuyo fundamento y procedimiento se describen, brevemente, a continuación:

DIAGRAMA DE FLUJO 1. EXTRACCIÓN DE RNA DE BIPOSIAS BRONQUIALES



El RNeasy[®] Microarray Tissue Mini Kit se basa en integrar una solución de fenol/guanidina(QIAzol Lysis Reagent) para lisar la muestra de tejido y una membrana de sílica para purificar el RNA total. El reactivo QIAzol es una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina que facilita la lisis del tejido en cuestión además de inhibir RNasas. La alta eficiencia de este reactivo de lisis y la subsecuente remoción de contaminantes (lípidos, proteínas) en la

extracción en la fase orgánica permite emplear grandes cantidades de tejido para purificar RNA mediante las columnas incluidas en el kit (RNeasy spin columns).

Las muestras de tejido se homogenizan con el reactivo de lisis QIAzol; después de la adición de cloroformo el homogenizado se separa en fases por centrifugación. El RNA se encuentra en la fase acuosa la cual se colecta y se le agrega etanol para proveer las condiciones adecuadas de unión a la columna.

Posteriormente la muestra se coloca en una columna RNeasy spin, en la cual, el RNA total se une a la membrana de la columna y el fenol y otros contaminantes son eficientemente eliminado. Finalmente se obtiene RNA de alta calidad, eluyendo el mismo con agua libre de RNAasas. Los pasos seguidos para la extracción se encuentra, a manera de flujograma en el diagrama 1.

5.4-. Cuantificación y análisis de la calidad del RNA total

El RNA extraído debe ser de calidad e integridad máxima, por lo que estos parámetros se evalúan empleando el Agilent RNA 6000 Nano Kit que es un chip que contiene una matriz de gel de un polímero de tamizaje, empleando la plataforma Agilent 2100 Bioanalyzer (ver figura 11). Este análisis consiste en un ensayo electroforético basado en los principios tradicionales de un gel de electroforesis de migración de las moléculas en un campo eléctrico, pero en formato de chip, el cual reduce considerablemente el tiempo de separación así como la cantidad de muestra empleada y de reactivos consumidos. Esta plataforma nos ofrece información cualitativa y cuantitativa en formato digital.



Figura 11. Plataforma Agilent 2100 Bioanalyzer; chip del Kit Agilent RNA 6000 Nano, que contiene una matriz de gel de agarosa, para verificar calidad e integridad del RNA y una imagen a manera de gel arrojada por el equipo.

Este análisis consiste en un ensayo electroforético basado en los principios tradicionales de un gel de electroforesis de migración de las moléculas en un campo eléctrico, pero en formato de chip, el cual reduce considerablemente el tiempo de separación así como la cantidad de muestra empleada y de reactivos consumidos. Esta plataforma nos ofrece información cualitativa y cuantitativa en formato digital.

En los pocillos de este chip se coloca el polímero de tamizaje, las muestras y un estándar externo (ladder). Los microcanales están fabricados en vidrio para crear una red interconectada entre los pozos. Durante la preparación del chip, los microcanales son llenados con un polímero de tamizaje y un fluorocromo (Cy5). Una vez que los pozos y los canales están llenos, el chip se convierte un circuito eléctrico integrado. Los 16 electrodos del cartucho del equipo están dispuestos de modo que encajan en los pocillos del chip.

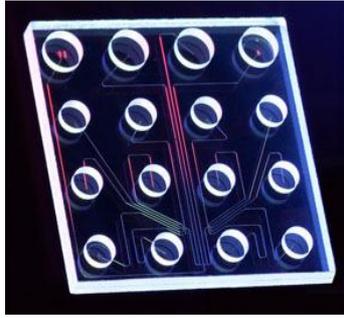


Figura 12. Estructura de los pozos y la red de microcanales del RNA Nano LabChip®.

Cada electrodo está conectado a un suministro independiente de corriente que proporciona el máximo control y flexibilidad. El RNA migra electroforéticamente impulsado por un gradiente de voltaje, similar a un gel de electroforesis. Debido a que la razón masa/carga es constante y a la presencia de la matriz del polímero de tamizaje, las moléculas se separan por tamaño. Los fragmentos pequeños migran de manera más rápida que los grandes. Las moléculas fluoróforas se intercalan en el RNA formando complejos (RNA-Cy5) los cuales son detectados por un láser. Los datos son mostrados como la imagen de un gel (bandas, ver figura 11) y electroferogramas (picos) (ver figura 13). Empleando el estándar o “ladder” el cual contiene fragmentos de RNA de tamaño conocido, una curva estándar de tiempo de migración *versus* tamaño de los fragmentos es trazada. Desde los tiempos de migración para cada fragmento en cada muestra, el tamaño de cada fragmento de RNA se calcula. Junto con cada muestra se corre un marcador de peso molecular, el cual es un estándar interno empleado para normalizar los datos de cada muestra con el estándar “ladder”, lo cual es necesario para compensar la desviación del dato numérico real de cada muestra durante la corrida del chip.

La cuantificación del RNA se realiza con ayuda del área bajo la curva que corresponde al estándar “ladder”, la cual se compara con la suma de las

áreas de los picos de cada muestra. Para RNA total (como es nuestro caso), la razón determinada del RNA ribosomal (28s/18s) nos indica la integridad de la muestra de RNA. Adicionalmente, el número de integridad de RNA (RIN), nos permite estimar la integridad del RNA total de cada muestra basados en el trazo del corrimiento electroforético de la muestra de RNA incluyendo la presencia o ausencia de productos de degradación. En una escala del 1 al 10, RIN de 10 indica la presencia de un RNA totalmente íntegro, sin ningún producto de degradación en tanto que RIN de 1, indicaría un RNA totalmente degradado. A continuación se muestra el electroferograma obtenido de una de las muestras el cual posee un RIN de 8.54, indicándonos una muy buena calidad en la integridad del RNA.

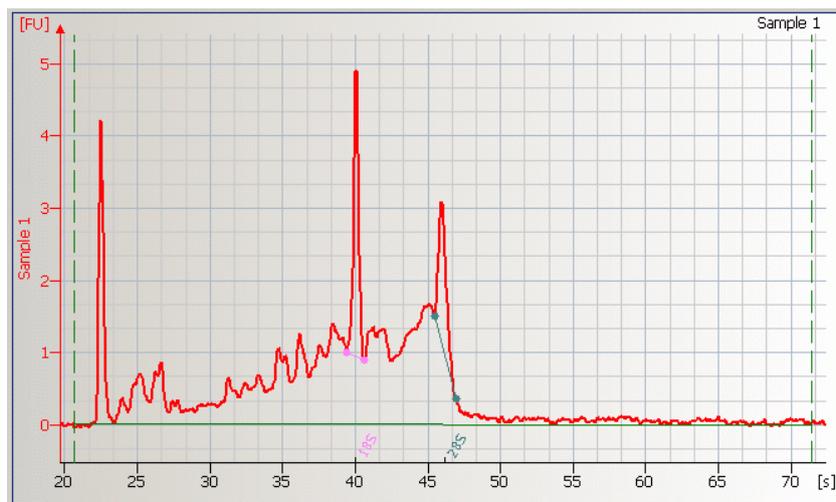


Figura 13. Electroferograma de una muestra. El primer pico corresponde al marcador de peso molecular o “ladder”, el segundo al RNAr 18s y el tercer pico al RNAr 28s. RIN=8,54.

Una vez evaluada la calidad y la cantidad de RNA, si no es empleado de manera inmediata, el mismo se almacena en tubos eppendorf, a -70°C.

5.5-. Síntesis de DNA complementario (cDNA).

Una vez analizado el RNA, éste se utilizó para realizar la síntesis del DNA complementario (en adelante cDNA), que fungió como blanco en la técnica de PCR en tiempo real. El RNA total extraído fue empleado como molde para sintetizar una cadena de DNA complementario (cDNA) a la cadena de RNA mediante una polimerasa de DNA dependiente de RNA, la transcriptasa inversa. Para la reacción se necesita de un cebador y se aprovecha la presencia de la cola de Poli A en el lado 3' del mRNA eucariótico al cual se le pega un oligo(dT). Para la síntesis de cDNA se empleó el Kit ThermoScript™ RT-PCR System de la casa comercial Invitrogen, cuya transcriptasa inversa aviar con reducida actividad RNasa H, está diseñada para tener una mayor estabilidad térmica, producir mayores rendimientos de cDNA y fragmentos transcritos de mayor integridad y longitud de cDNA. Mediante el empleo del equipo Mastercycler gradient (Eppendorf) para las temperaturas correspondientes en cada etapa del proceso de síntesis de cDNA, el procedimiento se describe a continuación, a manera de pasos.

1.- En un tubo de 0,2-0,5 mL realizar la siguiente mezcla de reacción:

Componente	Cantidad
Primer	1µL
RNA	10pg-5µg
10mM dNTP Mix	2µL
Agua DEPC	Para volumen de 12µL

2.- Desnaturalizar el tubo de reacción incubando a 65°C durante 5 minutos y luego colocar en hielo (opcional).

3.- Agitar en vórtex el Buffer de síntesis de cDNA 5X antes de su uso.

4.- Preparar una Master mix de reacción en hielo y agitada suavemente de la siguiente manera:

Componente	1 Rx.	10 Rx.
Buffer de síntesis de cDNA 5x	4 μ L	40 μ L
0,1 M DTT	1 μ L	10 μ L
RNasaOUT (40 U/μL)	1 μ L	10 μ L
Agua DEPC	1 μ L	10 μ L
ThermoScript RT (15 unidades/μL)	1 μ L	10 μ L

5.- Pipetear 8 μ L de la mezcla de reacción en cada tubo.

6.- Colocar la muestra en el termociclador con las condiciones apropiadas para la síntesis de cDNA (30-60 min a 50°C).

7.-Incubar a 60°C por 45min.

8.- Detener la reacción a 85°C por 5 min.

9. Agregar RNAsa H e incubar a 37°C por 20 min (opcional).

10.-Los tubos con las reacciones de síntesis de cDNA se almacenan a -20°C o puede ser empleado inmediatamente para PCR-tiempo real.

La síntesis de cDNA, como se describió anteriormente, constituyó la etapa previa a la realización de la técnica de PCR tiempo real, que es el siguiente paso y que se describe a continuación

5.6-. PCR en tiempo real, para análisis de expresión relativa de los genes CCL2, CCL8 y CXCL2.

Una vez que hemos sintetizado el cDNA, se procedió a realizar los ensayos de PCR en tiempo real. Aunque antes de entrar en los detalles de la técnica, es necesario describir el fundamento y objetivo de la técnica de manera breve.

5.6.1-. Fundamento de la técnica de PCR en tiempo real

De manera general, la técnica de PCR consta de un primer paso de calentamiento cerca de 95°C que desnaturizará el cDNA molde (templado), causando la separación de las cadenas polinucleotídicas, seguido de un enfriamiento a una temperatura aproximada de 55°C, que permite la hibridación de la pareja de oligonucleótidos de DNA (primer o cebadores) al cDNA molde. Por último, una polimerasa de DNA termoresistente, usa como referencia al cDNA molde para iniciar la síntesis de cadenas complementarias a éste. Esta síntesis se logra mejor a una temperatura aproximada de 72°C. De esta manera se va extendiendo la síntesis de nuevo DNA, lo que permite la ampliación secuencial del cDNA molde. Estos tres pasos se repiten entre 20 y 40 veces, lo que genera un aumento exponencial en la cantidad del cDNA amplificado.

La técnica de PCR en tiempo real es un método de amplificación y cuantificación simultánea, empleado en biología molecular para analizar o cuantificar secuencias de ácidos nucleicos (DNA/RNA). Esta técnica ofrece ciertas ventajas; entre ellas, a saber, se encuentran:

- a) La acumulación de producto de PCR se monitorea mientras se lleva a cabo la amplificación.
- b) Analiza ciclo a ciclo los cambios de la señal fluorescente generada durante las tres etapas de la PCR.
- c) Entre mayor sea la cantidad de cDNA en la muestra, menos serán los ciclos necesarios para obtener una señal fluorescente detectable.

Para que esta técnica pueda ser empleada como un método de cuantificación., debe poseer los siguientes parámetros básicos:

- ❖ Especificidad: La especificidad está dada por los primers y zona que reconocen un sitio específico de secuencia.
- ❖ Exactitud: Veracidad del valor medido en una muestra.
- ❖ Precisión: Presencia de poca dispersión en los datos obtenidos, es decir, es reproducible, “muestras de igual concentración darán siempre el mismo valor”.
- ❖ Sensibilidad: Una sola molécula de cDNA puede ser detectada por PCR en tiempo real. La señal fluorescente obtenida es significativamente mayor el ruido de fondo o background.

- ❖ Amplio rango dinámico: Ventana de cantidades en la que el blanco puede ser medido con exactitud y precisión.

La PCR en tiempo real, ha conseguido una amplia aceptación debido a su rapidez de implementación, sensibilidad, reproducibilidad y poco riesgo de contaminación, ya que la generación del amplicón puede observarse conforme la amplificación progresa, lo que elimina el análisis post PCR.

Al observar el proceso de amplificación se distinguen tres fases:

- 1) Fase Geométrica: Los reactivos de la reacción se encuentran en abundancia; en esta etapa la eficiencia de amplificación bajo las condiciones experimentales es muy cercana al 100%. En esta fase, la cinética de amplificación tiene un comportamiento 2^n en donde a partir de una molécula de cDNA se generan dos moléculas de DNA.
- 2) Fase Lineal: Los primers, dNTP's y/o la enzima comienzan a ser factores limitantes además de la generación de pirofosfato y decaimiento de la actividad enzimática que afectan la eficiencia de amplificación de manera constante, por lo que no es posible llevar a cabo un ensayo cuantitativo en esta parte.

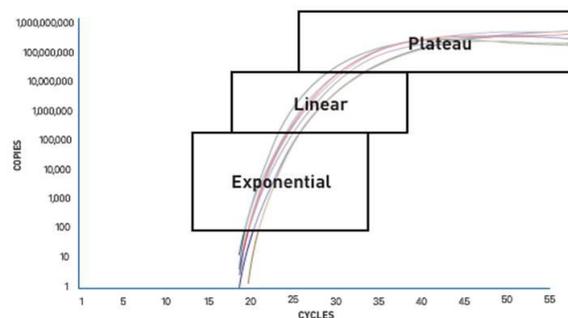


Figura 14. Fases del proceso de amplificación del cDNA por PCR en tiempo real.

3) Fase Estacionaria o Plateau: En este punto se detiene la amplificación; la cantidad de producto obtenida es constante sin importar cuantos ciclos más se prolongue la reacción.

Durante la fase geométrica, la eficiencia de amplificación es cercana al 100%, por lo que es posible predecir la cinética de amplificación mediante una ecuación matemática que evalúe la cantidad de templado inicial. Considerando lo anterior, la ecuación que describe la cinética de amplificación es:

$$P=T*(1+E)^n$$

Donde:

P=Cantidad de producto generada a “n” ciclos.

T= Cantidad de templado inicial

E= Eficiencia de amplificación

n= Número de ciclos.

Debido a que en la fase geométrica se mantiene la eficiencia de amplificación y esta es cercana al 100%, la variable E es prácticamente una constante=1. Por lo que la ecuación anterior se reduce a:

$$P= T*2^n$$

Sin embargo, lo que se desea obtener no es la cantidad de producto final sino la cantidad de templado inicial; así que, despejando las variables, tenemos que:

$$T=\frac{P}{2^n}$$

La gráfica que representa la cinética de amplificación de PCR en tiempo real se conoce como “Amplification plot”. En esta, observamos el tiempo o los

ciclos en el eje de las “x” y la intensidad de fluorescencia en el eje de las “y” (R_n) (Figura 15).

El “baseline” o línea base son los ciclos iniciales de la PCR en donde el cambio en la señal de fluorescencia es mínimo.

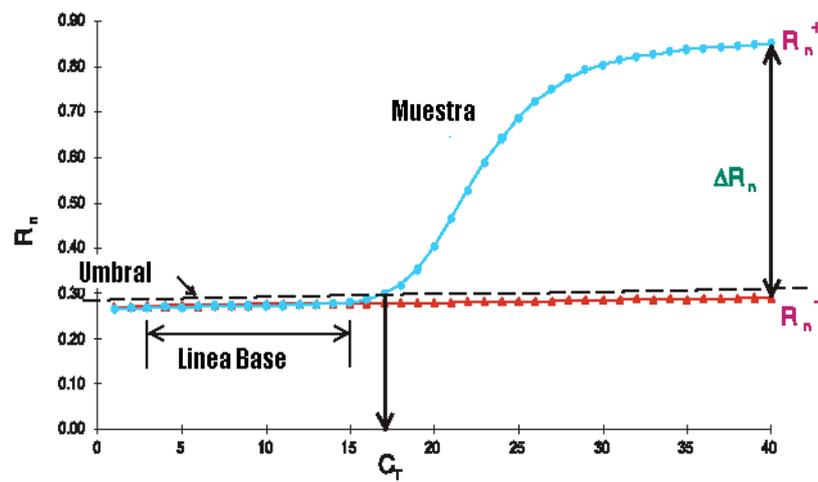


Figura 15. Características de una gráfica de amplificación en tiempo real.

Para efectuar los ensayos de cuantificación, dentro de la fase geométrica es necesario definir el punto de intensidad de fluorescencia o “umbral de detección” (Threshold), en el cual todas las muestras pueden ser comparadas entre sí. Dicho umbral se establece con base en la fluorescencia del background y equivale a 10 veces la desviación estándar de la media de emisión de la línea base.

Al ciclo en el cual cada muestra consigue llegar al umbral de detección, se le conoce como “ciclo de umbral de detección” (C_T , Treshold cycle), que es un número fraccional que indica cuantos ciclos le toma a cada muestra generar una cantidad suficiente de fluorescencia para llegar al umbral de detección.

Este valor es directamente proporcional a la cantidad de templado inicial (cDNA) y es el fundamento para calcular la cantidad de mRNA. Mientras mayor cantidad de cDNA en la muestra, menor número de ciclos para alcanzar el umbral de detección.

5.6.2-. Sondas TaqMan[®], como sistema de detección para PCR en tiempo real; fundamento.

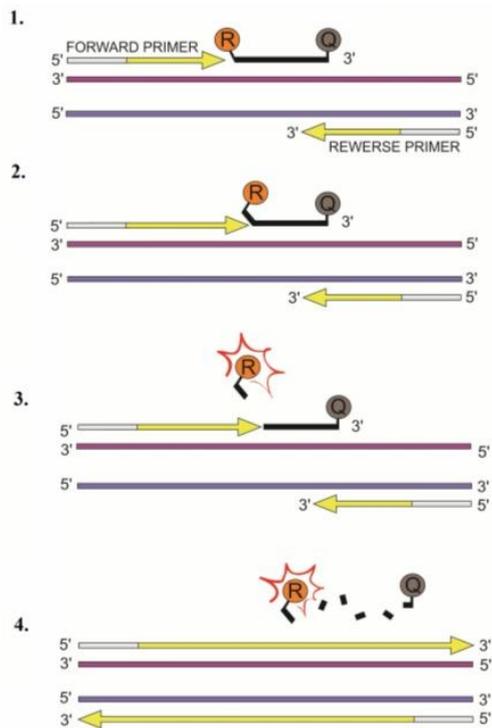


Figura 16. Detección de la amplificación de cDNA empleando sondas TaqMan[®].

En este estudio por PCR, se emplearon sondas específicas para cada gen, del sistema TaqMan[®] de la casa comercial Applied BiosystemsTM describiendo a continuación su fundamento.

Una sonda TaqMan[®], es un oligonucleótido cuya secuencia es complementaria a la región central del amplicón. Posee una longitud de 13 a 18 nucleótidos, y presenta en el extremo 5' una marca fluorescente (reportero) y en el extremo 3' un apagador (quencher).

Cuando estas dos moléculas se encuentran unidas en la sonda, toda la fluorescencia emitida por el reportero es absorbida por el apagador, por lo que la fluorescencia global observada es igual a cero. Este fenómeno se le denomina de Förster (o Fluorescente) Resonant Energy Transfer (FRET). Las sondas TaqMan[®] tienen una T_m mayor que los primers por lo que, durante la etapa de alineación, la sonda se una a su secuencia blanco específica **antes**

que los primers. De esta manera, cuando la enzima DNA polimerasa se une al extremo 3' del primer e inicia la elongación, en su paso se encuentra con la sonda y la degrada dada su actividad exonucleasa 5' → 3'. Al ser degradada, libera a la molécula reportera del apagador lo que suprime el fenómeno FRET y la fluorescencia emitida puede ser determinada por el sistema de detección del instrumento. Dado que la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de sonda degradada, y esta a su vez es proporcional a la cantidad de templado generado, esta técnica permite visualizar el incremento del amplicón a lo largo de la reacción de PCR.

6-. PROCESO DE OBTENCIÓN DE RESULTADOS

En este trabajo, se realizó una cuantificación relativa de los genes CCL2, CCL8 y CXCL2, que es una comparación cuantitativa de una secuencia blanco, normalizando con una referencia interna (gen endógeno) y comparado contra un calibrador, mediante el empleo del “Método de C_T comparativo ($\Delta\Delta CT$)” ⁽⁵⁸⁾.

Para efectuar este análisis fue necesario realizar una serie de consideraciones ⁽⁵⁹⁾:

- Fue necesario que los blancos junto con el control endógeno tuvieran una eficiencia de amplificación del 100%
- Fue necesario realizar un proceso de validación antes de cuantificar muestras reales, con la intención de demostrar que los genes a probar poseían eficiencias de amplificación semejantes y por tanto eran comparables.
- Fue el método ideal para validar resultados provenientes de microarreglos de DNA.

En este trabajo se empleo una sonda específica del gen HPRT (cuya localización se encuentra en el brazo q del cromosoma X en la posición Xq26.1, y que codifica para la enzima hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa, responsable de la transferencia del grupo 5-fosforribosil desde el fosforribosil-pirofosfato a la posición 9 de las bases hipoxantina o guanina, en presencia de magnesio, para formar el nucleótido respectivo y pirofosfato, involucrada en la vía de recuperación de purinas) como gen endógeno o

constitutivo; los niveles de RNAm del gen HPRT son muy bajos, 1 a 10 moléculas por célula, lo cual permite emplearlo como gen endógeno para ensayos de PCR en tiempo real⁽⁶⁰⁾.

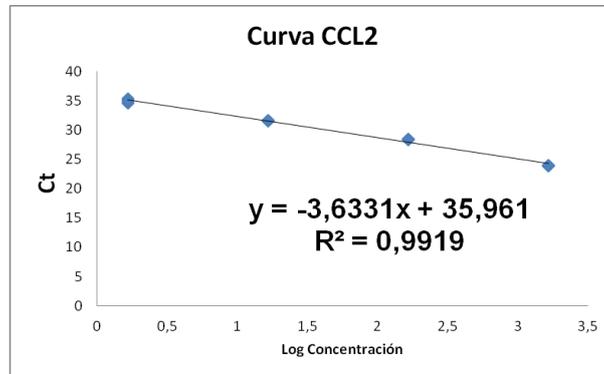
Además se utilizaron las sondas específicas para cada gen que son los blancos a cuantificar.

Para comprender el proceso de validación y entender, de manera ilustrativa los cálculos efectuados así como el origen de los resultados obtenidos, se mostrará a manera de ejemplo los resultados generados de un experimento de PCR en tiempo real de este trabajo con el gen CCL2⁽⁶⁰⁾.

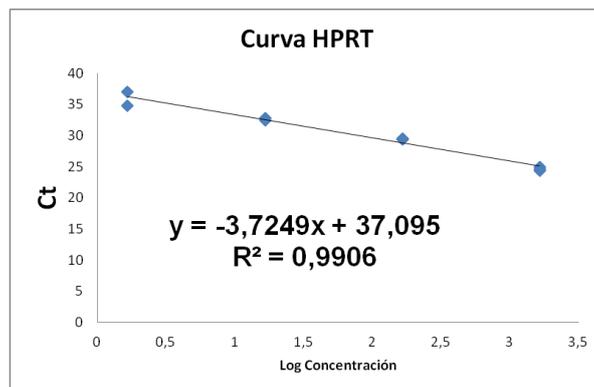
6.1-. Validación ⁽⁵⁸⁾

Esta se realizó con el fin de asegurar que tanto el gen blanco, como el gen elegido como endógeno (HPRT), poseían eficiencias de amplificación similares. Para validar se empleo una muestra de cDNA de concentración conocida (1657.3 ng/ μ L), a partir del cual se efectuaron las siguientes diluciones seriales: directo, 1:10, 1:100, 1:100, con el fin de construir una curva estándar. Se corrieron tres réplicas de cada punto de las diluciones antes mencionadas; se analizaron tanto el gen blanco (en este caso CCL2, aunque esto mismo se realizó para los tres genes), así como el gen endógeno (HPRT) en ensayos simples (por separado). De los datos de la amplificación se obtuvo el C_T promedio, el cual se graficó para formar una regresión contra el logaritmo de las concentraciones empleadas para la construcción de la curva. Se obtuvo un gráfico C_T promedio versus logaritmo de la Concentración de cada dilución

como el mostrado a continuación (se muestran los gráficos del gen blanco CCL2 y del gen endógeno HPRT):



Gráfica 1. Curva estándar del gen blanco CCL2.



Gráfica 2. Curva estándar del gen endógeno HPRT.

La regresión para cada gráfico debía cumplir con los siguientes parámetros:

Valor de pendiente de $-3.32 \pm 10\%$

Índice de correlación (R^2)= 0.99

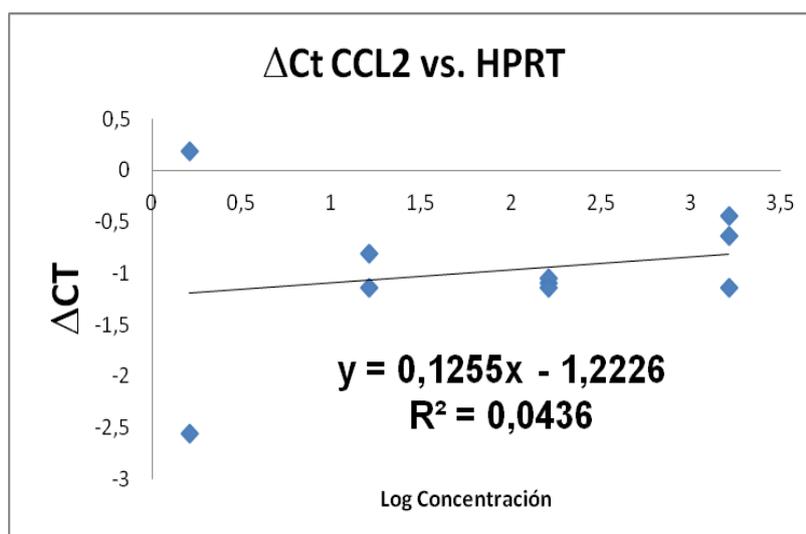
El valor de la pendiente nos indica la eficiencia que presenta el sistema (juego de primers y de sonda). El índice de correlación nos indica si el sistema muestra precisión (reproducibilidad). Como puede observarse, la validación del

sistema CCL2/HPRT (así como los otros dos sistemas CCL8/HPRT y CXCL2/HPRT), se ajusto a los criterios requeridos para poder continuar con el análisis.

Ahora, para poder finalizar la validación, los valores de C_T obtenidos, se emplearon para construir una gráfica ΔC_T siguiendo la siguiente ecuación:

$$\Delta C_T = C_T \text{ blanco} - C_T \text{ endógeno}$$

Los valores obtenidos de ΔC_T se grafican nuevamente contra los logaritmos de las concentraciones de cDNA, obteniéndose una gráfica como la mostrada a continuación:



Gráfica 3. Curva ΔC_T del gen CCL2 vs. HPRT.

La pendiente de esta curva puede emplearse como un criterio general para aprobar la validación; este valor debe oscilar entre -0.1 a 0.1 para aprobarla. El intervalo de concentraciones en la que se cumple esta pendiente (relación entre los dos genes en análisis) indica el rango dinámico de trabajo en que se pueden obtener resultados confiables. Como es posible notar este

criterio se cumplió por lo que se decidió trabajar solamente con la dilución 1:10 para correr el resto de las muestras.

6.2- Expresión relativa de los genes CCL2, CCL8 y CXCL2 empleando el método C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$)^(59, 60)

Una vez aprobada la validación y corridas las muestras problema para obtener su C_T , se procedió a efectuar el método $\Delta\Delta C_T$, el cual es un método de cuantificación relativa o de referencia, como su nombre lo indica. Para ello, con los valores de C_T de cada gen y de cada muestra, se obtiene un primer ΔC_T como se muestra a continuación:

$$\Delta C_T = C_T \text{ blanco} - C_T \text{ endógeno}$$

El segundo Δ ($\Delta\Delta C_T$), se obtiene al restar ΔC_T del calibrador o muestra de referencia al ΔC_T de la muestra tratada de la siguiente manera:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ tratamiento} - \Delta C_T \text{ calibrador}$$

Ejemplificando lo anterior con datos obtenidos de los experimentos realizados (se ejemplifica la expresión relativa del gen CCL2 en pacientes EREA en estado basal tomando como referencia a sujetos sanos en estado basal) tenemos lo siguiente:

De uno de los 4 pacientes EREA basal se obtiene un C_T promedio para el gen CCL2 de 27, 182 y para el gen HPRT de 32,731. Obtenemos el primer ΔC_T de la siguiente manera:

$$\Delta C_T = C_T \text{ blanco} - C_T \text{ endógeno} = C_T \text{ CCL2} - C_T \text{ HPRT} = 27,182 - 32,731 = - 5, 549$$

De igual manera se tiene un promedio de C_T 's para el sujeto sano en estado basal para ambos genes, como se muestra:

$$\Delta C_T = 31,545 - 35,495 = -3,950$$

Posteriormente obtenemos el segundo Δ , considerando como calibrador o referencia a los sujetos sanos en estado basal; es así que:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ tratamiento} - \Delta C_T \text{ calibrador} = -3,950 - (-5,549) = 1,599$$

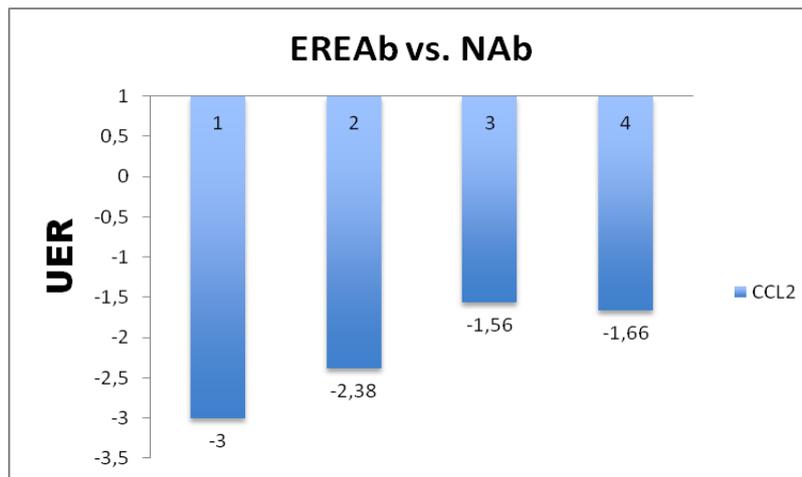
Y finalmente empleando la ecuación $2^{-\Delta\Delta C_T}$:

$$2^{-(1,599)} = 0,330$$

Este último valor de 0,330 constituye la expresión relativa del gen ejemplo, CCL2 en el paciente EREA en estado basal con respecto al paciente sano en estado basal. Sin embargo, este dato al encontrarse por debajo de la unidad, indica una subexpresión del gen CCL2; y, como dato individual y dado que implica la reducción en el nivel de expresión, para poder interpretarlo y graficarlo, es necesario emplear el inverso negativo ⁽⁶⁰⁾ de la expresión $2^{-\Delta\Delta C_T}$, por tanto tenemos que:

$$\text{Nivel relativo de expresión} = \frac{-1}{0,330} = -3$$

Y es entonces el valor numérico de -3 el que nos indica la subexpresión del gen CCL2 en unidades de expresión relativa (UER), y que graficamos; es entonces que se permite la construcción de la siguiente gráfica:



Gráfica 4. Expresión relativa del gen CCL2 de pacientes EREAb vs SANOSb.

7-. RESULTADOS

7.1-. Datos demográficos

	SANOS	ATA	EREA
Sujetos (n)	4	4	4
Edad media(años)	26	38,5	53,7
Sexo M:F	2:2	2:2	2:2
Atopia (%)	75	75	50
Biopsia bronquial pre	4	4	4
Biopsia bronquial pos	4	4	4

Tabla 4. Datos demográficos de la población en estudio.

7.2-. Selección de Grupos de Estudio para validación por RT-PCR tiempo real

Solo se validaron los grupos de estudio que por la tecnología de microarreglos se obtuvieron contrastes con validez significativa ($P \leq 0.05$ y $\log FCh \geq 1$) para los genes ya mencionados (ver tabla 5).

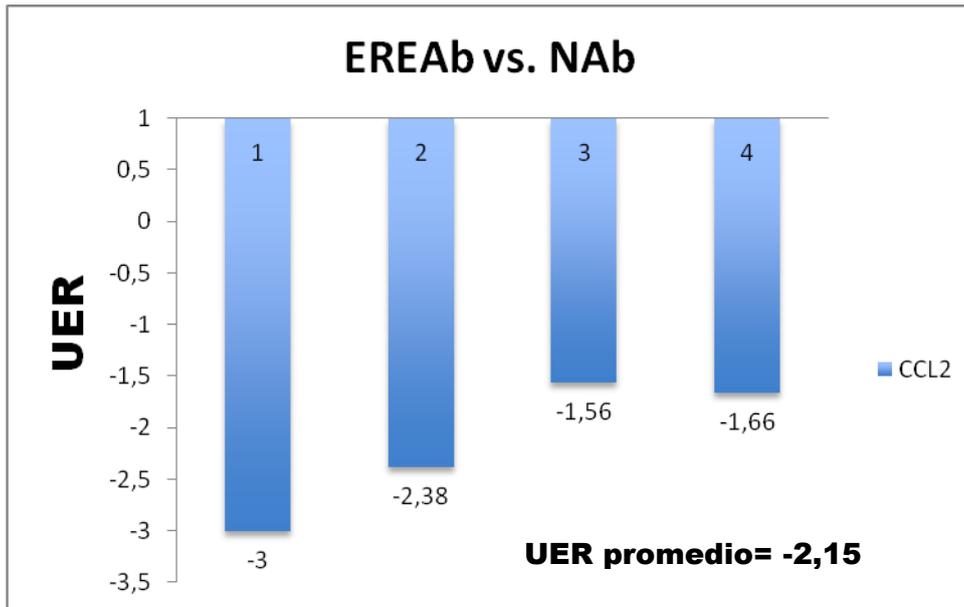
GEN	Grupo de estudio	Microarreglos (Log fold change)
CCL2	EREAb vs. NAb	-1,9
CCL2	ATAb vs. NAb	-2,45
CCL2	EREAr vs. EREAb	+1,66
CCL8	EREAb vs. NAb	-1,2
CCL8	ATAb vs. NAb	-1,2
CCL8	EREAr vs. EREAb	+1.67
CXCL2	SANOr vs. NAb	+1
CXCL2	ATAr vs. ATAb	+1,32
CXCL2	EREAr vs. EREAb	+1,08

Tabla 5. Grupos de estudio de microarreglos, seleccionados para validar por RT-PCR en tiempo real.

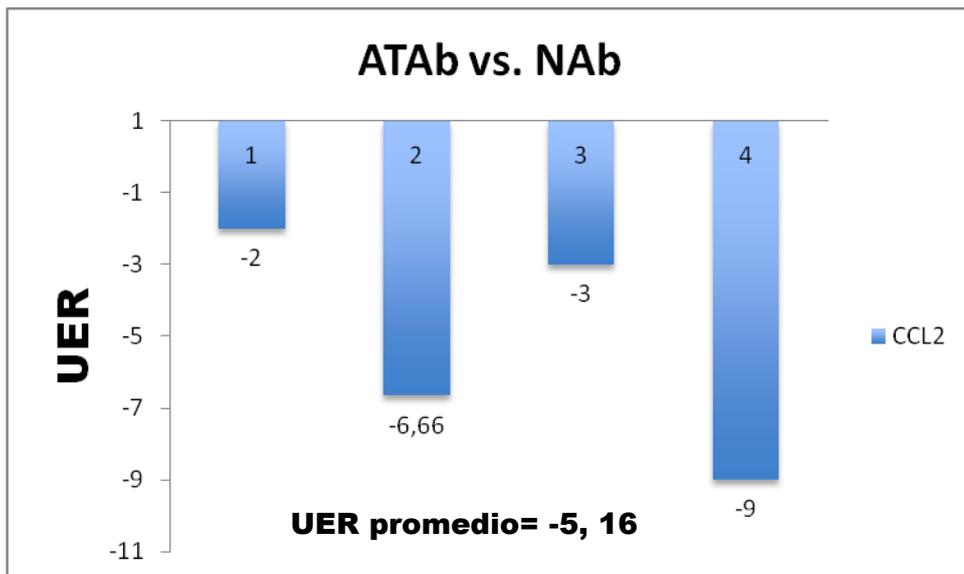
A continuación, en una serie de gráficas, se mostrarán los resultados obtenidos del análisis de expresión génica relativa de los genes CCL2, CCL8 y CXCL2, mediante el empleo de la técnica de PCR en tiempo real y del método C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$).

7.3-. Expresión relativa del gen CCL2 empleando el método C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$).

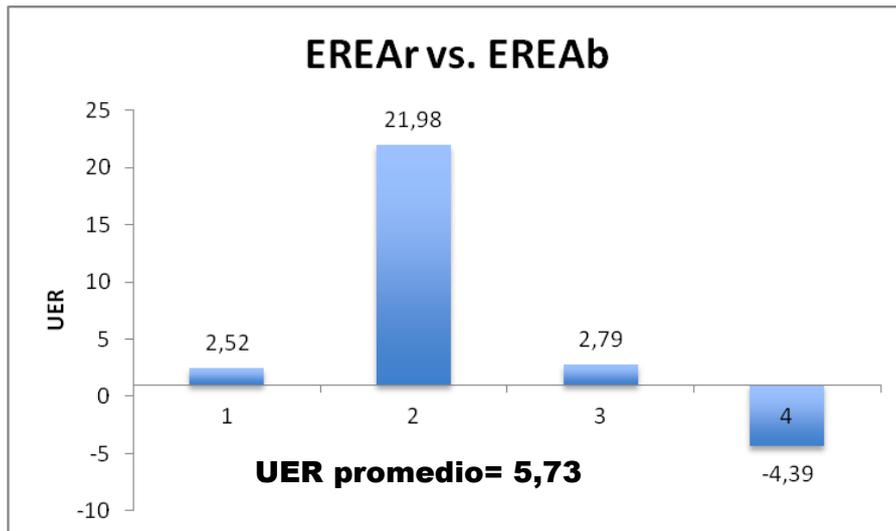
Los contrastes de expresión génica del gen CCL2 se analizaron sólo para los grupos de pacientes que resultaron significativos por la tecnología de microarreglos (ver gráfica 4, 5 y 6).



Gráfica 4. Expresión relativa del gen CCL2 de pacientes EREAb vs NAb.



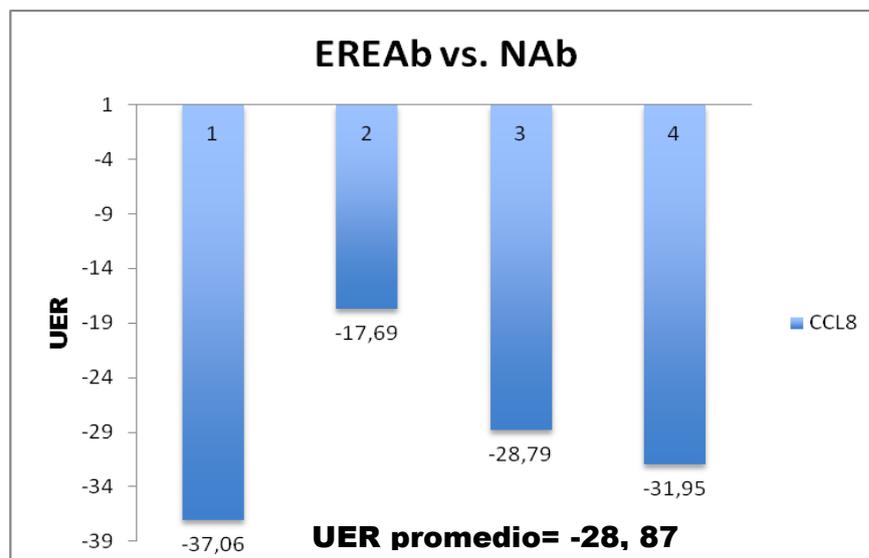
Gráfica 5. Expresión relativa del gen CCL2 de pacientes ATAb vs. NAb.



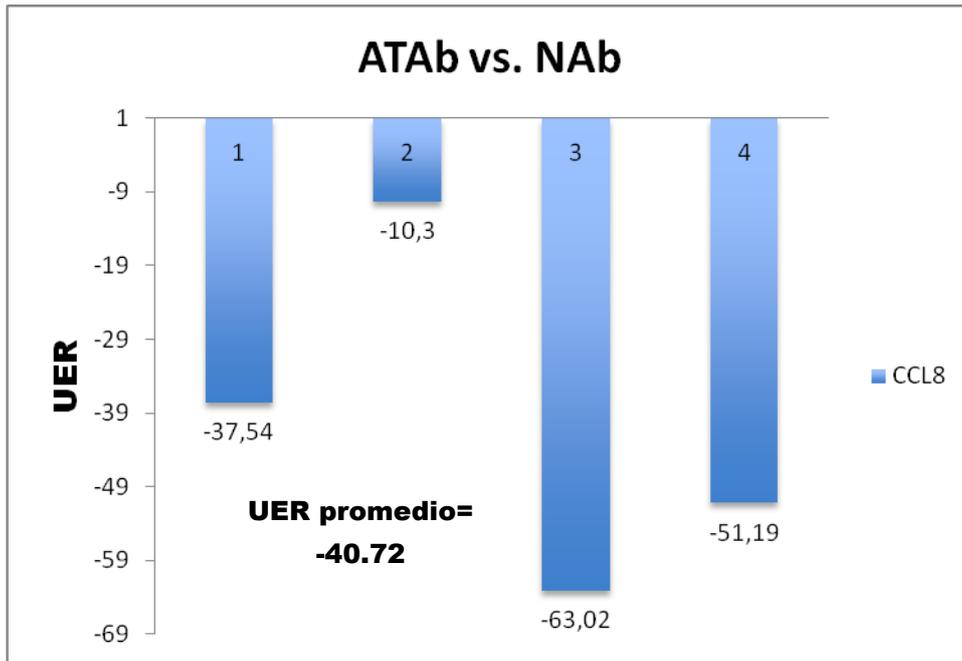
Gráfica 6. Expresión relativa del gen CCL2 de pacientes EREAr vs. EREAb.

7.4-. Expresión relativa del gen CCL8 empleando el método C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$).

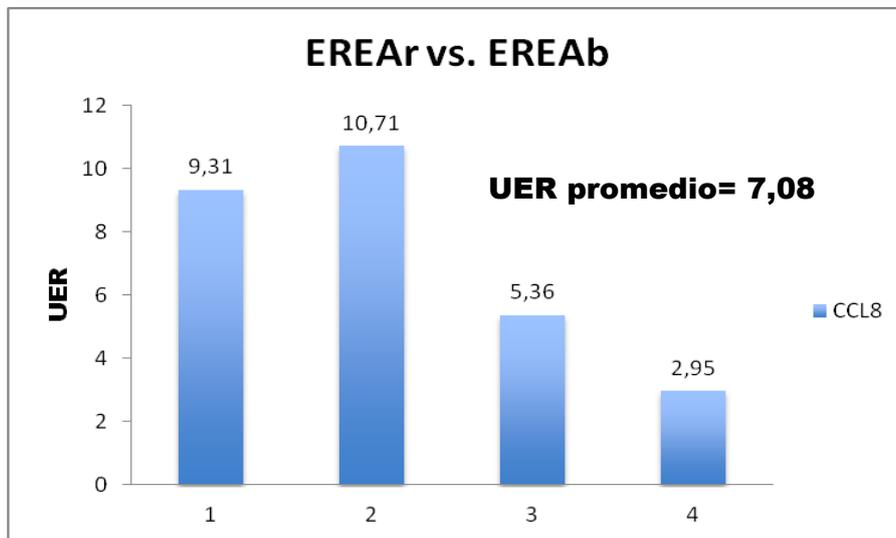
Los contrastes de expresión génica relativa del gen CCL8 se analizaron sólo para los grupos de pacientes que resultaron significativos por la tecnología de microarreglos (ver gráfica 7, 8 y 9).



Gráfica 7. Expresión relativa del gen CCL8 de pacientes EREAb vs. NAb.



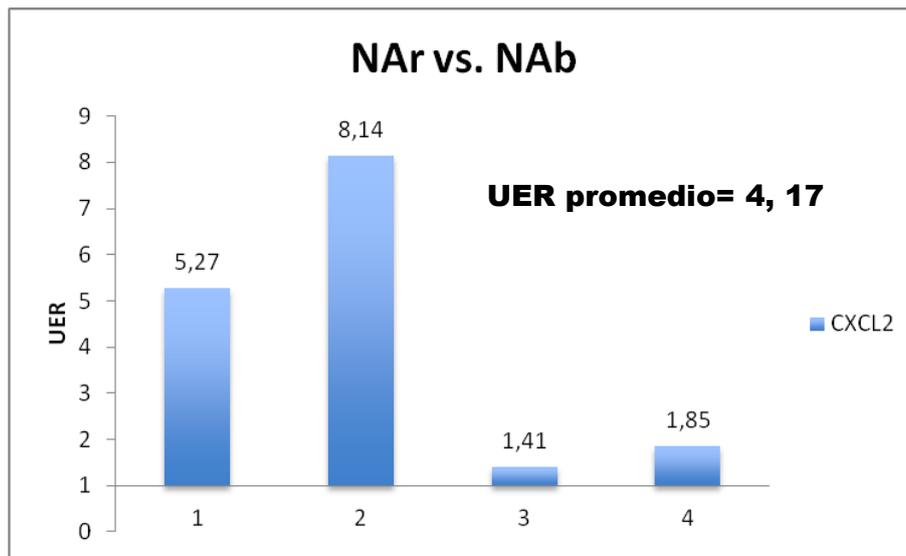
Gráfica 8. Expresión relativa del gen CCL8 de pacientes ATAb vs. SANOb.



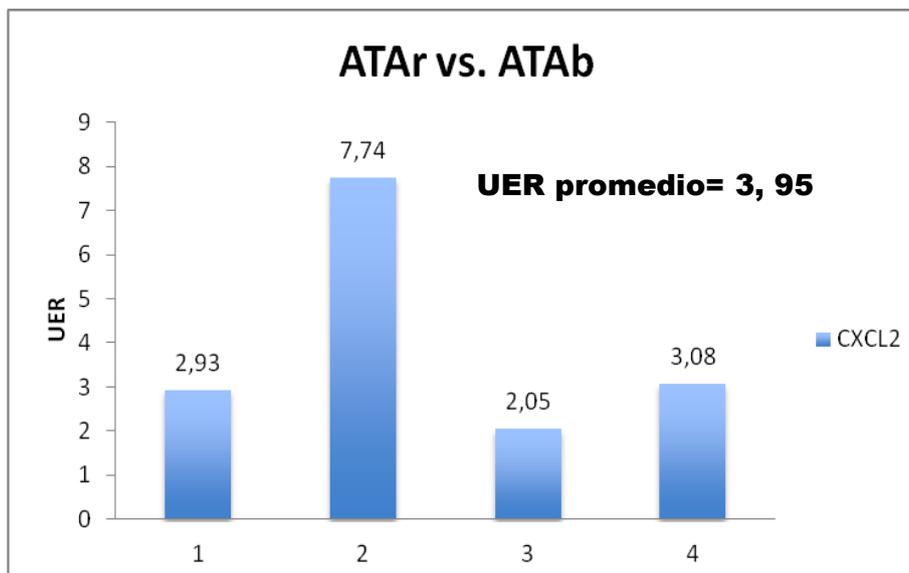
Gráfica 9. Expresión relativa del gen CCL8 de pacientes EREAr vs. EREAb.

7.5-. Expresión relativa del gen CXCL2 empleando el método C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$).

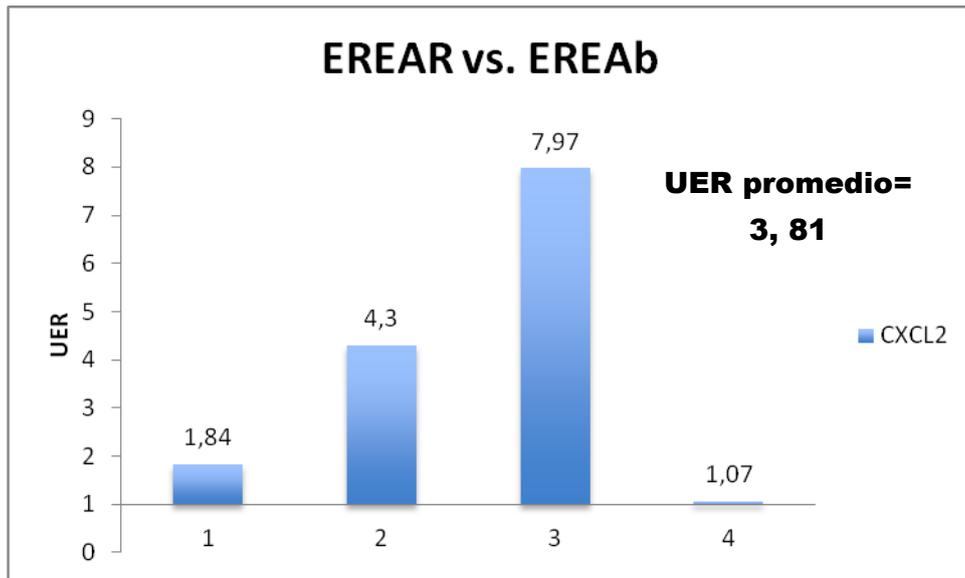
Los contrastes de expresión génica relativa del gen CXCL2 se analizaron sólo para los grupos de pacientes que resultaron significativos por la tecnología de microarreglos (ver gráfica 10, 11 y 12).



Gráfica 10. Expresión relativa del gen CXCL2 de pacientes NAr vs. NAb.



Gráfica 11. Expresión relativa del gen CXCL2 de pacientes ATAr vs. ATAb.



Gráfica 12. Expresión relativa del gen CXCL2 de pacientes EREAr vs. EREAb.

En la tabla 6, se encuentran concentrados los resultados obtenidos por RT-PCR tiempo real, y su comparativo con los obtenidos por microarreglos.

8-. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Como se menciona previamente en la introducción a este estudio, aunque existen diversos estudios sobre la EREA, poco se sabe sobre los mecanismos biológicos y moleculares implicados tras dicha enfermedad. El argumento más ampliamente aceptado es el que propone la alteración en el metabolismo del ácido araquidónico; sin embargo éste mecanismo no nos aclara completamente las consecuencias graves que presentan los pacientes con EREA y menos aún, la respuesta aguda letal que presentan dichos pacientes después de enfrentarlos con el o los agentes desencadenantes de la EREA.

Como también se destacó, las quimiocinas son moléculas altamente participativas en procesos de tipo inflamatorio y en particular, en las que se enfoca este estudio (CCL2, CCL8 y CXCL2) son representativas de ser quimiotácticas y quimioatrayentes de monocitos y macrófagos primordialmente. Discutamos primero los perfiles de expresión relativa del gen CCL2. (Ver gráficas 4, 5 y 6). De acuerdo a los resultados que se muestran en la tabla 6 para este gen, entre el grupo de pacientes EREA en estado basal (EREAb) contra pacientes No Asmáticos en estado basal (NAb) es posible apreciar de manera clara que en los pacientes EREA que no han sido sometidos al reto con L-ASA al compararlos contra pacientes sanos bajo la misma condición, el gen CCL2 se encuentra, de antemano, subexpresado.

Finalmente, cuando se comparo el grupo de los EREAr contra los EREAb el gen CCL2, se sobre expresa. Primeramente, podemos notar que, observando la tabla 6 se aprecia claramente que los resultados que obtuvimos por RT-PCR tiempo real para CCL2, fueron congruentes con la técnica de

GEN	Grupo de estudio	Microarreglos (Log fold change)	PCR (UER)*
CCL2	EREAb vs. NAb	-1,9	-2,15
CCL2	ATAb vs. NAb	-2,45	-5,16
CCL2	EREAr vs. EREAb	+1,66	5,73
CCL8	EREAb vs. NAb	-1,2	-28,87
CCL8	ATAb vs. NAb	-1,2	-40,72
CCL8	EREAr vs. EREAb	+1,67	7,08
CXCL2	SANOr vs. NAb	+1	4,17
CXCL2	ATAr vs. ATAb	+1,32	3,95
CXCL2	EREAr vs. EREAb	+1,08	3,81

Tabla 6. Cuadro comparativo de resultados de los grupos de estudio obtenidos mediante microarreglos y RT.PCR tiempo real. UER* indica promedio.

microarreglos; de acuerdo a estos resultados, podemos suponer que el gen CCL2 muestra una respuesta suprimida en pacientes con la enfermedad del asma sin mostrar diferencia alguna con los asmáticos sensibles a la aspirina

(EREA); adicionalmente podemos afirmar que CCL2 podría funcionar como un posible biomarcador para distinguir los sujetos asmáticos de los que no lo son, ya que se ve una clara diferencia entre este grupo y los sanos. De forma contrastante, se observa también que este mismo gen, CCL2, interesantemente cambia su expresión, de una negativa a una sobre expresión fuertemente positiva, lo que nos hace suponer su posible papel relevante en la participación en alguna de las vías metabólicas en las que participa el ácido acetil salicílico en la enfermedad en estudio, EREA, lo que hace que CCL2 sea un fuerte candidato en investigaciones posteriores que nos ayuden a conocer más, sobre los mecanismos que participan en la patofisiología de la EREA.

Analicemos ahora los perfiles de expresión relativa del gen CCL8 (Ver gráficas 7, 8 y 9). Basándonos en los resultados concentrados en la tabla 6, podemos notar lo siguiente: primeramente, al igual que para CCL2, el gen CCL8 quedó plenamente validado con respecto a los resultados obtenidos por microarreglos. Y que al igual que para el gen CCL2, el gen CCL8 también tiene un comportamiento muy similar en los grupos de pacientes analizados, es decir, hubo una marcada sub expresión entre el grupo de EREAb y ATAb con respecto a los NAb y una marcada sobre expresión solamente para el grupo de los EREAr vs EREAb. Al igual que en el primer caso, y de acuerdo con los resultados para CCL8, podemos argumentar que este gen, puede estar participando en el desarrollo del proceso asmático tanto de los que son como los que no son tolerantes a la aspirina. Por lo que, afianzando dichos resultados con estudios más específicos, también este gen podría ser un potencial candidato a ser empleado como posible biomarcador de la enfermedad del

asma. Y enfocándonos al grupo de los EREAr vs EREAb para este mismo podemos observar que también CCL8 exagera su expresión por efecto de la aspirina, lo que lo hace también un fuerte candidato como altamente participativo en el o los mecanismos de patogénesis que se desencadenan en la EREA.

Por último, consideremos los resultados de los perfiles de expresión relativa del gen CXCL2 (Ver gráficas 10, 11 y 12).

De acuerdo con la tabla 6, se observa que en los tres grupos de estudio donde se obtuvieron diferencias significativas para CXCL2, por microarreglos, al ser validados por RT.PCR tiempo real fueron confirmados y muestran concordancia. Pero a diferencia de los genes anteriormente mencionados, este gen CXCL2, se sobre expresa en los tres diferentes grupos analizados. El hecho de obtener una sobre-expresión entre el grupo de los NAr vs. NAb, hace que éste gen se considere como “marcador inespecifico”. Por lo que sí bien los resultados obtendios por los microarreglos quedaron completamente validados por el RT-PCR tiempo real, es posible concluir que el gen CXCL2 no nos aporta datos relevantes sobre su posible participación en la EREA.

Los resultados apreciados anteriormente podemos tratar de equipararlos con algunos estudios relevantes que tratan de elucidar el papel de las quimiocinas en el desarrollo de asma y de la intolerancia a la aspirina. El estudio de Fulkerson P. C. y cols.⁽⁴⁸⁾ en un modelo murino, emplea un enfoque empírico para delimitar el amplio espectro de genes susceptibles de ser estudiados que se encuentran asociados o como responsables de la inducción de asma intolerante a la aspirina⁽⁴⁸⁾. La expresión de distintas quimiocinas

dentro del pulmón del asmático sugieren algunos mecanismos regulatorios específicos que pueden participar en las diversas etapas en el desarrollo del asma, y de manera indirecta, de la intolerancia a la aspirina; es así que, este grupo de investigación observa que mediante la inoculación de ciertos alérgenos, como la ovoalbúmina, algunas quimiocinas (entre ellas CCL2, CCL8 y CXCL2 que son objeto de interés al presente estudio) son expresadas en diferentes etapas del proceso inflamatorio pulmonar. A manera de esbozo, es interesante mencionar que, de acuerdo a Fulkerson P. C. y cols., se reporta que CCL2 es expresada en la fase temprana del proceso inflamatorio y se mantiene sobreexpresada durante todo ese tiempo. Curiosamente ellos reportan que, CXCL2 solo se expreso después de una segunda exposición al alérgeno y CCL8 solo lo hizo durante la fase temprana de la inflamación en una primera exposición al alérgeno mencionado ⁽⁴⁸⁾. En cierta manera, podemos ver que los resultados obtenidos en nuestro trabajo coinciden con los obtenidos por el grupo de Fulkerson para los genes estudiados. Aunque en nuestro caso podemos denominar al L-ASA como agente “alergénico”, y que permite hacer mucho más específico y dirigido nuestro estudio. Resaltemos que lo más interesante de nuestro trabajo es que los resultados obtenidos son provenientes directamente del pulmón, uno de los órganos blanco de la enfermedad, mediante el empleo de biopsias bronquiales, y que es donde se magnifica o exagera la respuesta aguda de la enfermedad.

Aunque la quimicióna CXCL2 pareciera que no es relevante en nuestro estudio, de acuerdo con el estudio de Fulkeson arriba mencionado, se hace interesante ver que ellos solo observaron su sobre-expresión después de una

carga adicional del alérgeno (en nuestro caso L-ASA), lo que nos hace pensar que, posiblemente, la expresión de esta quimiocina sea dosis-dependiente del “alérgeno”. Es entonces importante señalar en este punto que, en nuestro estudio base, la dosis de L-ASA que se eligió para realizar los retos bronquiales, correspondían solamente una decima parte de la que se registraba por reto nasal para cada paciente; esto con la finalidad de no generar en los pacientes una respuesta no controlable en el momento de efectuar las broncoscopías.

Es así que, lo anterior nos permite establecer el marco que da paso y justificación al estudio de los perfiles de expresión de las quimiocinas seleccionadas en este estudio. Es decir, se observa en el estudio anteriormente citado que, la expresión de diversas quimiocinas, entre ellas, las de interés al presente estudio se encuentran altamente implicadas en la patogénesis de la EREA, lo que da pie a continuar con el estudio de algunos de sus miembros para lograr la elucidación de su participación en la intolerancia a la aspirina.

También es importante destacar que, la elección y el empleo de la técnica de RT-PCR tiempo real para validar los genes que se encuentran implicados en la patogénesis de la EREA es crucial. Recientemente se publicó un estudio a cargo de Choi y cols ⁽⁶¹⁾, donde también ayudados por la tecnología de microarreglos, tratan de estudiar los genes implicados en la EREA. Sin embargo creemos que tiene varias desventajas con respecto a nuestro trabajo, ya que dicho estudio fue realizado solamente comparando los resultados de dos sujetos, uno sano y el otro con intolerancia a la aspirina, ambos en estados basal; además, las muestras biológicas manejadas

corresponden a células mononucleares de sangre periférica (CMSP), factores que demeritan sobremanera los resultados obtenidos en dicho trabajo. Y aunado a ello, en ningún momento validan los genes diferencialmente expresados entre sus dos sujetos de estudio, lo que deja totalmente insostenible las pseudo-hallazgos hechos por el autor mencionado.

Un estudio mucho más actual y que se aproxima a nuestros objetivos, es el efectuado por Shin y cols.⁽⁶²⁾ el cual además de estar enfocado específicamente en EREA y de obtener datos de microarreglos y validar los mismos por PCR en tiempo real, emprende la tarea de buscar un biomacador de la enfermedad, objetivo que nuestro proyecto final también lo persigue. Sin embargo este estudio, al igual que el de Choi, emplea CMSP, lo que de forma significativamente sustancial lo hace totalmente diferente al nuestro.

No es posible dejar de mencionar algunos otros trabajos similares que sí han hecho valiosos aportes sobre la EREA, como el de Laprise C. y cols ⁽⁶³⁾, y el estudio Zimmerman y cols.⁽⁶⁴⁾ , los cuales han sido diseñados con un grupo de estudio bastante aceptable, y un escrupuloso control de calidad en los resultados aportados. Pero aún así, nuestro trabajo sigue siendo de gran trascendencia, porque a la fecha no hay ningún reporte de microarreglos, donde se comparen los genes diferencialmente expresados después de un reto con el agente desencadenante, L-ASA, con los no retados, y sobre todo, al tratarse de biopsias bronquiales, involucra de manera directa al tejido implicado pudiendo tener una idea más certera de lo que está sucediendo *in vivo*.

Finalmente no está por demás mencionar que, el trabajo realizado en la elaboración de esta tesis constituye solamente una pequeña parte de un gran proyecto que tiene como finalidad llegar a dilucidar no solo a nivel génico las moléculas involucradas en la patofisiología de la EREA, sino tratar de encontrar un posible biomarcador para diagnóstico de la misma, pues hasta el momento no se cuenta con una prueba no invasiva para su temprana y pronta detección.

9- CONCLUSIONES

Nuestro estudio nos permite vislumbrar apenas el papel de las quimiocinas CCL2 y CCL8 como implicadas en la patogénesis de la EREA al observar que, solo en los pacientes EREA sometidos al reto con L-ASA, estas dos quimiocinas tienen un comportamiento de sobreexpresión en dichos pacientes. Es decir, que los resultados obtenidos sugieren que estas quimiocinas de la familia CCL, participan de manera directa en la patogénesis y exacerbación de la enfermedad, aunque entre otros puntos a destacar requerimos más estudios y aumento en el tamaño de la población en estudio para lograr una elucidación mayor sobre su papel en la EREA.

La quimiocina CXCL2 tiene una participación común en el asma como tal, es decir que tanto en los pacientes ATA como a los EREA, dicha quimiocina tiene el mismo papel y en nuestro estudio no nos aporta ningún dato relevante.

Para poder comprender aún más el papel de estas quimiocinas, se hace necesario aumentar el tamaño de muestra y, de ser posible, como se menciono, entonces proceder a la búsqueda de dicha proteína.

La tecnología de RT-PCR en tiempo real, resulta óptima e ideal para lograr una validación correcta y adecuada de los resultados obtenidos mediante la técnica de microarreglos.

10- BIBLIOGRAFÍA

1. Babu K S, Salvi S S; **Aspirin and asthma**. Chest. 2000; 118(5): 1470-1476
2. Farooque S, Lee T; **Aspirin-sensitive respiratory disease**. Annu. Rev. Physiol. 2009; 71: 465-487
3. Stevenson DD, Szczeklik A; **Clinical and pathologic perspectives on aspirin sensitivity and asthma**. J Allergy Clin Immunol. 2006; 118: 773-786
4. Plikhe NS, Kim J, Park H; **Update on recent advances in the management of aspirin exacerbated respiratory disease**. Yonsei Med J. 2009; 50(6): 744-750
5. Vane JR, Bakhle YS, Botting M; **Cyclooxygenases 1 and 2**. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1998;38:97–120. Health & Medical Complete. p.97.
6. Schäfer D, and Maune S. **Pathogenic Mechanisms and In Vitro Diagnosis of AERD**. Vol 2012, 18 pages, Journal of Allergy.
7. Szczeklik A, Stevenson DD. **Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis and management**. J Allergy Clin Immunol. 1999; 1: 5-13
8. Agache I., Akdis C., Jutel M & Virchow J.C.; **Untangling asthma phenotypes and endotypes**. Allergy 2012; 67: 835–846.
9. Lemansk Jr R.F., & Busse W W; **Asthma: Clinical expression and molecular mechanisms**. J Allergy Clin Immunol 2010;125:S95-102.
10. Chang H.S., Park J-S, Jang A-S., Park S-W., Uh S-T., Kim H. Y., Park C-S; **Diagnostic Value of Clinical Parameters in the Prediction of Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease in Asthma**. Allergy Asthma Immunol Res. 2011 October;3(4):256-264.
11. Meltzer E; Szwarcberg J; and Pill,M W. **Allergic Rhinitis, Asthma, and Rhinosinusitis: Diseases of the Integrated Airway**. J Manag Care Pharm. 2004;10(4):310-17

12. Scadding G.K.; Durham S. R.; Mirakian R.; Jones N.S.; Drake-Lee A.B.; Ryan D., Dixon T.A., Huber P.A.J. & Nasser S.M; **BSACI guidelines for the management of rhinosinusitis and nasal polyposis**. *Clinical and Experimental Allergy*, 38, 260–275
13. Bloemen K, Verstraelen S, Van Den Heuvel R, Witters H, Nelissen I, Schoeters G; **The allergic cascade: Review of the most important molecules in the asthmatic lung**. *Immunology Letters* 113 (2007) 6–18
14. Garcia Cruz M, Jimenez-Chobillon M. A, & Teran L.M.; **Rhinosinusitis and Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease**. *Journal of Allergy*. Vol 2012, Article ID 273752, 8 pages.
15. Shifren A, Witt C, Christie C, and Castro M; **Mechanisms of Remodeling in Asthmatic Airways**. *Journal of Allergy*. Vol 2012, Article ID 316049, 12 pages
16. Bradding P, Walls A. F., and Holgate S. T; **The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma**. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:1277-84.
17. Vane J.R; **Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs**. *Nature New Biology* 1971(231.25:232-5)
18. Nizankowska-Mogilnicka E, Bochenek G, Mastalerz L, Swierczyńska M, Picado C, Scadding G, Kowalski ML, Setkowicz M, Ring J, Brockow K, Bachert C, Wöhrl S, Dahlén B, Szczeklik A; **EAACI/GA2LEN guideline: aspirin provocation tests for diagnosis of aspirin hypersensitivity**. *Allergy* 2007; 62: 1111–1118
19. Gonzalez-Perez R, Poza-Guedes P, Vives-Conesa R; **The nose as a target organ in the diagnosis of severe aspirin-exacerbated respiratory disease**. *Am J Rhinol Allergy* 25, 166-169, 2011.
20. Casadevall J, Ventura P J, Mulloj J, Picado C; **Intranasal challenge with aspirin in the diagnosis of aspirin intolerant asthma: evaluation of nasal response by acoustic rhinometry**. *Thorax*. 2000; 55: 921-924
21. Baggiolini M; **Chemokines in pathology and medicine**. *Journal of Internal Medicine* 2001; 250: 91-104
22. Zlotnik A and Yoshie O; **Chemokines: A New Classification System and Their Role in Immunity**. *Immunity* 2000, Vol. 12, 121–127

23. Matsushima H, Terashima Y, Toda E, Shand F and Ueha S; **Chemokines in inflammatory and immune diseases**. Inflammation and Regeneration 2011, Vol 31 No.1, 11-22
24. Lukacs N W, Oliveira S. H. P, and Hogaboam C. M; **Chemokines and asthma: redundancy of function or a coordinated effort?** The Journal of Clinical Investigation. 1999, Vol. 104, No. 8, 995-999
25. Manel J and Roger C; **Chemokines and Chemokine Receptors**. In: Encyclopedia of Life Sciences. 2009. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester
26. Rollins B. J; **Chemokines**. Blood. 1997; (90) 909-928
27. Le Y, Zhou Y, Iribarren P and Wang J M; **Chemokines and Chemokine Receptors: Their Manifold Roles in Homeostasis and Disease**. Cellular & Molecular Immunology. 2004;1(2): 95-104.
28. Zimmermann N, Hershey G K, Foster P S, and Rothenberg, M E; **Chemokines in asthma: Cooperative interaction between chemokines and IL-13**. J Allergy Clin Immunol 2003;111: 227-42.
29. Mahajan S and Mehta A. A; **Role of Cytokines in Pathophysiology of Asthma**. Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics, Vol. 5, No. 1, 2006, 1-14
30. Stables M J, and Gilroy W D; **Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution**. Prog Lipid Res (2010),17 pages.
31. Ravichand D.M, Laxmipathi K, Sheshayamma V, Abhay A.P; **Cytokine and Chemokine modulators as novel targets for Asthma**. Indian J Allergy Immunol, 2006; 20(1): 53-65
32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
33. Lezcano-Meza D, Dávila-Dávila B, Vega-Miranda A, Negrete-García M C, and Teran L M; **Interleukin (IL)-4 and to a lesser extent either IL-13 or interferon-gamma regulate the production of eotaxin-2/CCL24 in nasal polyps**. Allergy, vol. 58, no. 10, pp. 1011–1017, 2003.
34. Pods R, Ross D, Van Hülst S, Rudack C, and Maune S; **RANTES, eotaxin and eotaxin-2 expression and production in patients with aspirin triad**. Allergy, vol. 58, no. 11, pp. 1165–1170, 2003.

35. Kupczyk M, Kurmanowska Z, Kupryś-Lipińska I, Bocheńska-Marciniak M, Kuna P; **Mediators of inflammation in nasal lavage from aspirin intolerant patients after aspirin challenge.** *Respir Med.* 2010; 104(10):1404-1409.
36. Teran L M, Park H S, Djukanovic R, Roberts K, and Holgate S; **Cultured nasal polyps from nonatopic and atopic patients release RANTES spontaneously and after stimulation with phytohemagglutinin.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 100, no. 4, pp. 499–504, 1997.
37. Meyer J E, Berner I, Teran L M et al.; **RANTES production by cytokine-stimulated nasal fibroblasts: its inhibition by glucocorticoids.** *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 117, no. 1, pp. 60–67, 1998.
38. Fuentes-Beltrán A, Montes-Vizuet R, Valencia-Maqueda E, Negrete-García M C, García-Cruz M D L, and Teran L M; **Chemokine CC-ligand 5 production and eosinophil activation into the upper airways of aspirin-sensitive patients.** *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 39, no. 4, pp. 491–499, 2009.
39. Rot A, von Andrian UH. **Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells.** *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 891-928.
40. Lukacs NW. **Role of chemokines in the pathogenesis of asthma.** *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 108-16.
41. Stellato C, Brummet ME, Plitt JR, Shahabuddin S, Baroody F M, Liu M C, Ponath P D and Beck L A; **Expression of the C-C chemokine receptor CCR3 in human airway epithelial cells.** *J Immunol* 2001; 166: 1457-61.
42. Shrestha-Palikhe N, Kim S H, Jin H J, Hwang E K, Nam Y H, Park H S; **Genetic mechanisms in aspirin-exacerbated respiratory disease.** *Journal of Allergy* Vol 2012, Article ID 794890, 6 pages
43. Kim S H, Yang E M, Lee H N, Choi G S, Ye Y M. and Park H S; **Association of the CCR3 gene polymorphism with aspirin exacerbated respiratory disease.** *Respir Med* 2010; 104: 626-32.

44. Kacprzak D and Pawliczak R; **Functional studies of genes involved in pathogenesis of aspirin-induced asthma.** Postep Derm Alergol 2012; XXIX, 3: 161–168
45. Robinson, D. S., Q. Hamid, M. Jacobson, S. Ying, A. B. Kay, and S. R. Durham; **Evidence for Th2-type T helper cell control of allergic disease in vivo.** Springer Semin. Immunopathol, 1993. 15:17.
46. Seminario, M. C., and G. J. Gleich; **The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma.** Curr. Opin. Immunol.1994; 6:860.
47. Lee, N. A., E. W. Gelfand, and J. J. Lee.; **Pulmonary T cells and eosinophils: coconspirators or independent triggers of allergic respiratory pathology?** J. Allergy Clin. Immunol. 2001; 107:945.
48. Fulkerson P C, Zimmermann N, Hassman L M, Finkelman F D and Rothenberg M E; **Pulmonary Chemokine Expression Is Coordinately Regulated by STAT1, STAT6, and IFN- γ .** The Journal of Immunology, 2004, 173: 7565–7574.
49. Asero R; **Multiple sensitivities to NSAIDs.** Allergy 2000; 55:893-4.
50. Quaratino D, Romano A, Di Fonso M, Papa G, Perrone MR, D’Anbroia FP, et al; **Tolerability of meloxicam in patients with histories of adverse reactions to nonsteroidal anti-inflammatory drugs.** Ann Allergy Asthma Immunol 2000;84:613-7.
51. Bavbek S, Celik G, Ediger D, Mungan D, Demirel YS, Misirligil Z; **The use of nimesulide in patients with acetylsalicylic acid and nonsteroidal anti-inflammatory drug intolerance.** J Asthma 1999; 36:657-63.
52. Keane M P & Strieter R S; **The importance of balanced pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms in diffuse lung disease.** Respir Res 2002, 3:5.
53. Keane MP, Arenberg DA, Lynch JP 3rd, Whyte RI, Iannettoni MD, Burdick MD, Wilke CA, Morris SB, Glass MC, DiGiovine B, Kunkel SL, Strieter RM: **The CXC chemokines, IL-8 and IP-10, regulate angiogenic activity in idiopathic pulmonary fibrosis.** J Immunol 1997, 159:1437-1443.

54. Keane MP, Belperio JA, Moore TA, Moore BB, Arenberg DA, Smith RE, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM: **Neutralization of the CXC chemokine, macrophage inflammatory protein-2, attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis.** J Immunol 1999, 162:5511-5518
55. Keane MP, Belperio JA, Arenberg DA, Burdick MD, Xu ZJ, Xue YY, Strieter RM: **IFN-gamma-inducible protein-10 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of angiogenesis.** J Immunol 1999, 163:5686-5692.
56. BD Harrison; **Guidelines for care during bronchoscopy. British Thoracic Society.** Thorax 1993 48: 584.
57. Krug, N., Terán, L.M., Redington, A., Gratziou, S. Montefort, R. Polosa, H. Brewster, P. H. Howarth, S. T. Holgate, A. J. Frew, and M. P. Carroll; **Safety aspects of local endobronchial allergen challenge in association with bronchoalveolar lavage and endobronchial biopsy in asthmatic patients.** Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1995;153:1391-1397.
58. Bustin S A, Benes V, Garson J A, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl M W., Shipley G L., Vandesompele J, and Wittwer C T. **The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.** Clinical Chemistry 55:4, 611–622 (2009).
59. Livak K J. and Schmittgen T D. **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method.** Methods. 25, 402–408 (2001).
60. Schmittgen T D & Livak K J. **Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method.** Nature Protocols. Vol.3, No.6, 2008, 1101-1108.
61. Choi S, Park H-S, Cheon M S and Lee K; **Expression profile analysis of human peripheral blood mononuclear cells in response to aspirin.** Arch Immunol Ther Exp, 2005, 53, 151-158.
62. Shin S W, Park J S, Kim Y-J, Oh T J, An S, Park C-S; **Differential gene expression profile in PBMCs from subjects with AERD and ATA: a gene marker for AERD.** Mol Genet Genomics (2012) 287:361–371.

63. Laprise C, Sladek R, Ponton A, Bernier M-C, Hudson T J and Laviolette M; **Functional classes of bronchial mucosa genes that are differentially expressed in asthma.** BMC Genomics 2004, **5**:21
64. Zimmermann N, King NE, Laporte J, Yang M, Mishra A, Pope SM, Muntel EE, Witte DP, Pegg AA, Foster PS, Hamid Q, Rothenberg ME; **Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis.** J Clin Invest 2003, 111:1863-1874.