



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL
FACTOR INDUCIBLE EN HIPOXIA 1A EN
CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE
PERIFÉRICA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON
ASMA, CRISIS ASMÁTICA Y SANOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN: ALERGOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
CLÍNICA PEDIÁTRICA

PRESENTA:

Dra. Palmira Delgado Barrera

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Sara Huerta Yopez

TUTORES DE TESIS

Dra. Blanca Estela Del Río Navarro

Dr. Jaime del Río Chivardi



MÉXICO D.F., Febrero del 2015



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).

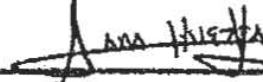
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

DRA. REBECA MARIA GOMEZ CHICO VELASCO

Directora de Enseñanza y Desarrollo Académico

Hospital Infantil de México Federico Gómez

DIRECTOR DE TESIS



DRA. HUERTA YEPEZ

Jefe del Departamento de Investigación en Enfermedades Oncológicas

Hospital Infantil de México Federico Gómez

TUTOR CLÍNICO Y METODOLÓGICO

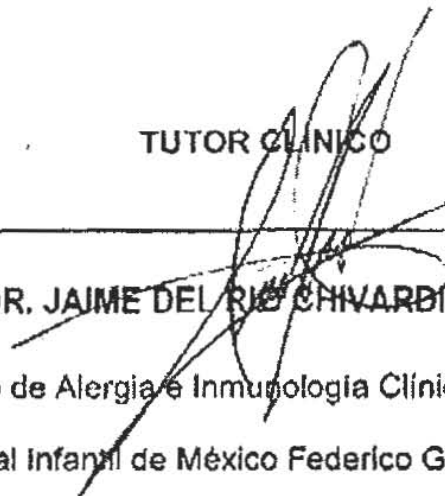


DRA. BLANCA E. DEL RIO NAVARRO

Jefe del Departamento de Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica

Hospital Infantil de México Federico Gómez

TUTOR CLÍNICO



DR. JAIME DEL RIO CHIVARDI

Departamento de Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica

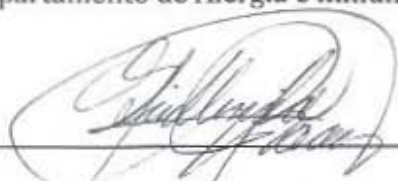
Hospital Infantil de México Federico Gómez

ASESORES



DR. OMAR J. SAUCEDO RAMÍREZ

Departamento de Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica



DRA. GULLERMINA BAAY GUZMAN

Departamento de Investigación en Enfermedades Oncológicas

AGRADECIMIENTOS

Te agradezco Dios por brindarme la oportunidad de vivir, de amar, de soñar y de dedicarme a lo que más me apasiona.

A ti mamá, te dedico este trabajo, por nunca rendirte, por darme tanto amor, por ofrecerme día a día tu apoyo incondicional.

A mi hermano y a mi hermana, por ser parte de mi vida. Hatz, por escucharme, por hacerme entrar en consciencia, por estar a mi lado siempre, gracias.

A mis tutores y asesores, por la confianza, el apoyo y por el tiempo empleado en este estudio.

"Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida.

Detrás de cada logro, hay otro desafío.

Mientras estés vivo, siéntete vivo.

Si extrañas lo que hacías, vuelve a hacerlo.

No vivas de fotos amarillas...

Cuando por los años no puedas correr, trota.

Cuando no puedas trotar, camina.

Cuando no puedas caminar, usa el bastón.

¡Pero nunca te detengas! "

Madre Teresa de Calcuta

INDICE

I. Introducción_	6
II. Marco Teórico_	7
III. Antecedentes_	25
IV. Plantamiento del problema_	27
V. Pregunta de investigación_	28
VI. Justificación_	29
VII. Objetivos_	30
VIII. Hipotesis_	31
IX. Material y métodos_	32
X. Plan de analisis estadístico_	36
XI. Descripción de variables_	37
XII. Resultados_	40
XIII. Discusión_	42
XIV. Conclusion_	46
XV. Cronograma de actividades_	47
XVI. Limitación del estudio_	47
XVII. Referencias_	48
XIII. Anexos_	51

I. INTRODUCCIÓN

El asma es una de las enfermedades crónicas más frecuentes, se estima una prevalencia de 300 millones de personas que padecen asma, con al menos 250, 000 muertes anuales atribuidas a la enfermedad.^{1,2}

En México, se calcula que al menos del 6- 12% de los niños sufren y estas cifras se han mantenido a la alza, sobre todo en el grupo de escolares.⁴

Se ha reportado en recientes estudios, que el factor de transcripción inducible en hipoxia- 1α juega un papel importante en la patogénesis de la inflamación y en la remodelación de la vía aérea del asma en modelos murinos, y en tejido bronquial de pacientes adultos asmáticos, y que su expresión se correlaciona con la gravedad del asma.^{6, 28- 32}

II. MARCO TEÓRICO

El asma

El asma es una de las enfermedades crónicas más prevalentes en todo el mundo, se estima que 300 millones de personas sufren de asma, con 250.000 muertes anuales atribuidas a la enfermedad. Se estima que el número de personas con asma crecerá en más de 100 millones para el 2025.¹

El asma es una inflamación crónica pulmonar asociada con hiperreactividad de la vía aérea que lleva a episodios de sibilancias, disnea, opresión torácica y tos. Estos síntomas particularmente son en la noche o en la mañana. Los episodios usualmente están asociados a obstrucción de la vía aérea de forma reversible, ya sea espontáneamente o con tratamiento.²

Puede cursar con atopia, la cual es manifestada como la presencia de pruebas cutáneas positivas, o la respuesta clínica a los alérgenos ambientales.

La hiperreactividad es la tendencia de las vías aéreas inferiores a estrechar su diámetro de forma excesiva en respuesta a disparadores, que tienen ninguna o poca respuesta en individuos sanos.²

De acuerdo a datos de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud en México, en el 2012 se reportó un total de 317,783 de casos de asma y estado asmático, lo cual traduce una tasa de incidencia de 290.96 casos por cada 100,000 habitantes, de los cuales más de la mitad de los casos anuales reportados de asma se presentan en población pediátrica.⁴

Hay factores que influyen el desarrollo y la expresión del Asma²:

Factores del Huésped

- Genética (genes que predisponen a la atopia,)
- Microbiota
- Obesidad
- Sexo

Factores ambientales

- Alérgenos: intradomiciliarios: ácaros del polvo doméstico, caspa de animales, alérgeno de la cucaracha, hongos
- Infecciones (predominantemente virales) (Hipótesis de la Higiene?)
- Sensibilizadores ocupacionales

Humo de tabaco: activo o pasivo.
 Contaminación del aire
 Dieta

Diagnóstico

Es una enfermedad con diagnóstico fundamentalmente clínico. Se inicia el abordaje diagnóstico con la historia clínica. Es de utilidad en el diagnóstico los antecedentes, historia familiar de asma, enfermedad atópica personal previamente diagnosticada, síntomas episódicos después de la exposición con algún alérgeno, variabilidad de síntomas según la estación del año. La exploración física puede no brindar ningún hallazgo en periodos asintomáticos. La medición de la función pulmonar es utilizada en pacientes mayores de 5 años, siendo la espirometría de gran utilidad, (FEV1, FEV1/FVC).²

Clasificación

Se puede clasificar según su gravedad a la presentación, GINA (por sus siglas en ingles, Global initiative for asthma, Iniciativa global para el asma) 2006, NAEPP (por sus siglas en ingles, National Asthma Education and Prevention Program, Programa nacional para la educación y prevención del asma, realizada en Estados Unidos de América). También se puede clasificar según su control (GINA 2012, NAEPP), por grupo etario.²

Tabla de Clasificación por gravedad GINA2006²

Intermitente	Leve persistente	Moderada persistente	Grave persistente
Síntomas <1 vez/semana	Síntomas >1 vez/semana	Síntomas diarios Uso diario β 2 agonista	Síntomas diarios
Exacerbaciones de corta duración	Exacerbaciones pueden afectar actividad y sueño	Exacerbaciones afectan actividad y sueño	Exacerbaciones frecuentes Limita actividad

			física
Síntomas nocturnos \leq 2 veces/ mes	Síntomas nocturnos >2 veces/mes	Síntomas nocturnos >1 vez/semana	Síntomas de asma frecuentes
FEV ₁ o PEF \geq 80% del predicho Variabilidad $<20\%$	FEV ₁ o PEF \geq 80% del predicho Variabilidad 20%-30%	FEV ₁ o PEF 60-80% del predicho Variabilidad $>30\%$	FEV ₁ o PEF \leq 60% del predicho Variabilidad $>30\%$

Fisiopatología

Los estudios histopatológicos demuestran variaciones estructurales en la vía aérea de los pacientes afectados en comparación con sujetos sanos, lo cual se denomina remodelación de la vía aérea, la cual abarca alteraciones estructurales en las células y tejidos, esto fue descrito por primera vez hace más de 85 años por Huber y Koessler³ en su descripción clásica del asma fatal.

Se puede considerar esta remodelación como consecuencia de un proceso inflamatorio crónico que al reparar de forma prolongada la vía aérea produce alteración en su estructura, lo cual puede asociarse a la sintomatología progresiva de la enfermedad, ya que algunos de estos cambios se han relacionado con la gravedad del padecimiento y pueden resultar en un estrechamiento irreversible de la luz de la vía aérea. Los cambios implicados son infiltración inflamatoria, cambios en las células epiteliales, en la membrana basal con fibrosis subepitelial, cambios en unidades secretoras de moco (células caliciformes y glándulas mucosas), en la innervación nerviosa, en la musculatura lisa bronquial y cambios en la vasculatura bronquial.²

Historia natural de la remodelación de las vías respiratorias

Varios estudios han demostrado que los pacientes asmáticos experimentan una disminución acelerada de la función pulmonar en comparación a los sujetos sanos y que es proporcional con la duración y la gravedad de su enfermedad. Otros estudios han informado que los niños asmáticos tienen función pulmonar deficiente, lo que sugiere que la remodelación podría comenzar tempranamente en el curso de la enfermedad, sin embargo el inicio de la remodelación de las vías respiratorias en

pacientes asmáticos no está aún bien caracterizado. Los datos del Programa de Manejo del Asma Infantil (Childhood Asthma Management Program) mostró un descenso acelerado en las pruebas de función pulmonar entre las edades de 5 y 18 años en niños con asma leve a moderada.^{22, 23, 24, 25, 26.}

La remodelación y las intervenciones terapéuticas

Remodelación de la vía aérea ha sido el foco de una cantidad significativa de investigación en la última década, sin embargo, la cuestión fundamental sigue siendo una interrogante en cuanto a si la intervención terapéutica tiene ninguna influencia sobre la remodelación.

Debido a su efecto antiinflamatorio sobre vías respiratorias, se pensó que los corticosteroides inhalados tenían un gran potencial para influir en la remodelación de las vías aéreas. Sin embargo, los datos disponibles hasta la fecha son más bien contradictorios y no concluyentes. Por otra parte, los estudios funcionales no han podido demostrar un efecto sustancial de los corticosteroides inhalados en la inhibición de la disminución de la función pulmonar en pacientes con asma.⁵

Las evidencias indican claramente que las anomalías funcionales en los pacientes asmáticos son el resultado de las respuestas de remodelación de tejidos y alteraciones estructurales en las vías respiratorias.⁵

Aún se necesita saber cómo cada una de estas características de la remodelación de la vía aérea contribuye a los síntomas presentados y a la historia natural del asma. También se necesitan más investigaciones para determinar los tipos de intervenciones capaces de alterar las diversas características de la remodelación de las vías respiratorias y el efecto de estas intervenciones sobre las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Por otra parte, es importante desarrollar mejores herramientas no invasivas y biomarcadores específicos que ayudarán a determinar con precisión las diferentes subpoblaciones de pacientes asmáticos. Haciendo hincapié en que las investigaciones deben ser dirigidas a los factores genéticos asociados a los diferentes tipos y grados de remodelación tisular y la traducción funcional de estas modificaciones genéticas. Estos y otros estudios pueden ayudar a la comprensión de la patogénesis del asma y pueden dar algunas estrategias para controlar efectivamente la progresión del asma.²⁷

Las alteraciones epiteliales

Los cambios morfológicos en el epitelio de las vías respiratorias son una característica clave de la remodelación de las vías respiratorias en pacientes asmáticos. Las alteraciones epiteliales en pacientes asmáticos incluyen desprendimiento del epitelio, la pérdida de las células ciliadas, hiperplasia de células caliciformes y la regulación al alza de los factores de crecimiento, citoquinas y quimiocinas. Recientemente, se ha demostrado que la función de barrera del epitelio de las vías respiratorias en pacientes asmáticos es anormal, exhibiendo una ruptura de la integridad epitelial a lo largo de las uniones estrechas epiteliales, sin embargo, es importante señalar que los cambios epiteliales no son un rasgo característico sólo de asma y puede ser observado en pacientes con diversas condiciones patológicas de los pulmones.⁵

La secreción de moco y las células caliciformes

La hipersecreción de moco de las mucinas MUC5AC y MUC5B por las células caliciformes es una característica fisiopatológica de la remodelación de las vías respiratorias en pacientes con asma. Se ha demostrado que las citocinas TH2 (predominantemente IL- 9 e IL- 13), así como de IL- 1b, TNF- α , COX- 2 y sus vías de señalización intracelulares asociadas, están implicadas en la regulación al alza de la síntesis de mucina y el desarrollo de hiperplasia de células caliciformes.⁵

La fibrosis subepitelial

Los fibroblastos son las células estrelladas grandes y planas que se encuentran en estrecha proximidad con el epitelio basal. En un ambiente inflamatorio tal como las vías respiratorias asmáticas, los fibroblastos se activan y se diferencian en miofibroblastos, que forman proteínas de la matriz extracelular, incluyendo colágena I, III y V y fibronectina. El compartimiento de la matriz extracelular de la vía respiratoria es dinámica, lo que refleja el saldo neto de la síntesis y la degradación, que está regulado por la acción de metaloproteinasas de la matriz y por inhibidores de metaloproteinasas. Sin embargo, un cambio en este equilibrio hacia el aumento de la matriz da como resultado fibrosis, lo que lleva a la alteración de la estructura y a las propiedades mecánicas anormales. En los pacientes asmáticos la susceptibilidad a lesión y las respuestas de reparación aberrante dan como resultado la activación persistente de los fibroblastos, lo que lleva a la fibrosis subepitelial.⁵

El aumento de la masa muscular lisa

Las células musculares constituyen las principales células estructurales dentro de los bronquios, y su incremento es la causa principal de obstrucción de vías aéreas. En las vías respiratorias asmáticas la masa muscular aumenta significativamente a causa de

la proliferación de células por hiperplasia y por el tamaño de las células, hipertrofia. Además de los cambios estructurales, las células de músculo liso participan en el proceso inflamatorio y de remodelación a través de la expresión de moléculas de adhesión celular, receptores de citoquinas, quimiocinas (RANTES, eotaxina, proteína inflamatoria de macrófagos 1a, y la IL- 8) y por activación de receptores tipo Toll. La expresión en la superficie de las moléculas de adhesión por las células de músculo liso podría ser crucial en la regulación de las interacciones de una gran variedad de células inflamatorias.⁵

La angiogénesis

Fisiológicamente existe una red de capilares sistémicos que rodean la vía aérea desde sus porciones centrales hasta los bronquiolos. Los capilares subepiteliales traqueobronquiales convergen en plexos más profundos con los capilares pulmonares drenados por las venas pulmonares. Las células endoteliales de la vasculatura pulmonar regulan la selectividad y especificidad del infiltrado celular en la vía aérea.⁵

La angiogénesis es un proceso que se define como el crecimiento y proliferación de vasos sanguíneos de neoformación, y en conjunto con la vasodilatación y edema de la pared son componentes reconocidos de los casos leves, moderados y fatales de asma, contribuyendo de forma importante al edema y rigidez de la vía aérea en estos casos.

Se ha demostrado tanto en adultos como en niños que la vía aérea de pacientes con asma moderada es más vascularizada y tiene un número mayor de vasos por milímetro cuadrado de submucosa y que la vasculatura es de mayores dimensiones que en los pacientes no asmáticos sanos. Estos cambios estructurales, aunados al edema de estas nuevas estructuras vasculares, contribuyen a un diámetro luminal disminuido en la vía aérea.⁵

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la angiopoyetina-1 (Ang-1) y Angiopoyetina- 2 (Ang-2) son factores de crecimiento celular claramente implicados en la remodelación vascular de la vía aérea, y asimismo se ha asociado a otros factores de crecimiento no específicos.⁵

El VEGF es encontrado en las células del epitelio bronquial, células mononucleares y linfocitos T. Este factor ha mostrado múltiples funciones reguladoras de la angiogénesis, entre ellas estimulación de la proliferación epitelial, de la formación de vasos sanguíneos y sobrevivencia de las células endoteliales, y se ha mostrado su expresión ante estímulos tales como el estrés mecánico y la hipoxia por medio del

factor inducible en hipoxia (HIF-1). De hecho, el VEGF actúa al incrementar la permeabilidad de estos vasos sanguíneos anormales, resultado de la dilatación y el edema, que contribuyen al estrechamiento de las vías respiratorias. Además de proporcionar la nutrición a las vías respiratorias, estos vasos son la fuente de las células inflamatorias y de sus mediadores inflamatorios.⁵

Se han encontrado niveles elevados de VEGF y Ang-1 en el esputo y la submucosa bronquial de pacientes asmáticos adultos. En la submucosa el incremento de VEGF, identificado por inmunohistoquímica, se ha asociado de forma directamente proporcional con el área vascular y de forma inversamente proporcional con el calibre de la vía aérea.⁵

Otro mecanismo identificado como promotor de la angiogénesis es la hipoxia, es decir, la disminución de oxígeno tisular que se manifiesta cuando las concentraciones de oxígeno son menores a las requeridas para el mantenimiento fisiológico de la tensión de oxígeno en los tejidos. La respuesta generada por la hipoxia cuenta de tres etapas: 1) la detección de hipoxia por sensores a cambios de oxígeno, 2) la regulación de genes, y 3) una etapa efectora donde se da la expresión de genes y los cambios funcionales que éstos involucran. Dicha respuesta es modulada por el factor inducible en hipoxia 1 (HIF-1), el cual activa genes que facilitan la adaptación y supervivencia de las células y el mantenimiento de concentraciones normales de oxígeno (21%) ante la hipoxia. A pesar de que en el asma se tiene bien caracterizada la hipoxia, no fue sino hasta diciembre de 2006 cuando se publicó el primer reporte donde se concluyó que las subclases del factor inducible en hipoxia HIF-1 α y HIF-2 α se encuentran elevados en modelos asmáticos en comparación con los controles.⁵

Las exacerbaciones de asma se asocian con hipoxemia que puede persistir durante varios días en el 90% de los sujetos. La causa de la hipoxemia en la mayoría de las exacerbaciones del asma se debe a la alteración de la perfusión/ventilación. Además, los estudios de laboratorio en los asmáticos han demostrado que la hipoxia determina la percepción de síntomas que incluyen dificultad para respirar, opresión en el pecho, falta de aliento. Las exacerbaciones del asma también se asocian con la inflamación neutrofílica de las vías respiratorias en adultos, inflamación eosinofílica y neutrofílica en niños, y una mayor disminución de la función pulmonar. En la actualidad existe poca información con respecto a si la hipoxia durante las exacerbaciones de asma contribuye a la remodelación tisular o a la disminución de la función pulmonar de la vía aérea.⁶

El factor inducible en hipoxia

El factor inducible en hipoxia 1 (HIF-1), es un factor de transcripción que activa genes que facilitan la adaptación y supervivencia de las células y el mantenimiento de estados de normoxia (concentraciones normales de oxígeno) (21% O₂) y ante la hipoxia (1% O₂).⁷

Hasta la fecha se ha reportado que este factor regula la transcripción de más de 100 genes implicados en procesos de angiogénesis, eritropoyesis, metabolismo energético, glucólisis, apoptosis, crecimiento celular, supervivencia y movilidad celular. El HIF-1 fue descrito en 1991¹ al identificarse los elementos que responden a hipoxia en el gen de la eritropoyetina, responsable de la eritropoyesis.⁸

El factor inducible en hipoxia 1 es un complejo heterodímero constituido por dos subunidades α y β homólogas, la subunidad inducible en situaciones de hipoxia es la HIF-1 α y la subunidad expresada constitutivamente es la HIF-1 β .⁹

En normoxia, la subunidad de la proteína HIF-1 α se degrada rápidamente, dando como resultado el que no sea detectable. Durante la hipoxia, HIF-1 α se estabiliza y se transloca desde el citoplasma al núcleo, donde se dimeriza con HIF-1 β , y el complejo formado se convierte en HIF transcripcionalmente activo.¹⁰

El factor inducible en hipoxia es parte de la familia de proteínas bHLH- PAS, las cuales describen los dominios de unión a ADN básico hélice-bucle-hélice (bHLH) y un dominio de dimerización Per/Arnt/Sim (PAS). La proteína Per está implicada en la regulación del ritmo circadiano en mamíferos. ARNT (translocador del receptor para arilo hidrocarburos) funciona como un receptor intracelular para los xenobióticos y participa en la detoxificación celular. Sim es el factor del desarrollo neuronal en mamíferos. Teniendo en sus extremos un dominio N-terminal, la cual le confiere la especificidad del blanco genético.¹¹

El factor inducible en hipoxia 1 α , es la subunidad inducible en hipoxia, tiene una vida media de uno a dos minutos en condiciones de normoxia debido a que sus concentraciones sólo se incrementan en estados de hipoxia, dificultando la detección de la proteína; sin embargo el ARNm puede encontrarse de forma constitutiva y no se altera por los cambios de oxígeno. El peso molecular es de 120-130 kDa y tiene siete regiones o dominios que son: en el extremo N-terminal entre 17-30 aminoácidos tiene el dominio básico en el que está un dominio o secuencia consenso para la señal de localización nuclear, fundamental para su translocación nuclear de la proteína; entre los 31-71aa está el dominio hélice-bucle-hélice (HLH), seguido por el dominio de PAS

(85-298aa) que contiene dos unidades internas homólogas denominadas A (85-158aa) y B (228-298aa); los dominios bHLH/PAS son esenciales para la dimerización con HIF-1 β y la unión al ADN.¹²

El requerimiento de oxígeno y Fe²⁺ para la hidroxilación de las prolinas puede explicar la estabilidad de HIF-1 α que se observa en condiciones de hipoxia o después del tratamiento con agentes que eliminan o compiten por el Fe²⁺. Estudios recientes encontraron que el oxígeno está implicado en la formación de especies reactivas de oxígeno y en la fosforilación y nitrosilación de proteínas. Estos cambios pueden afectar de manera directa o indirecta la hidroxilación de HIF-1 α .¹²

HIF-1 α es la más estudiada de las subunidades α , está en todas las células cuando hay hipoxia, HIF-2 α es homólogo en su secuencia de aminoácidos de la subunidad 1 α en 48% y se encuentra en células endoteliales, en la carótida y en el pulmón; HIF-3 α se describió después y se expresa en pocos tejidos uniéndose también a los elementos que responden a hipoxia, y el último miembro descrito de esta familia, el IPAS (inhibidor de PAS), es un proceso de corte de la subunidad 3 α , su función es la de regulador negativo de HIF-1 α uniéndose a éste y evitando su unión al ADN; IPAS predomina en las células de Purkinje del cerebelo y en el epitelio corneal, pero puede inducirse por hipoxia en el corazón y el pulmón, HIF-1 β dimeriza con todas las subunidades α .¹²

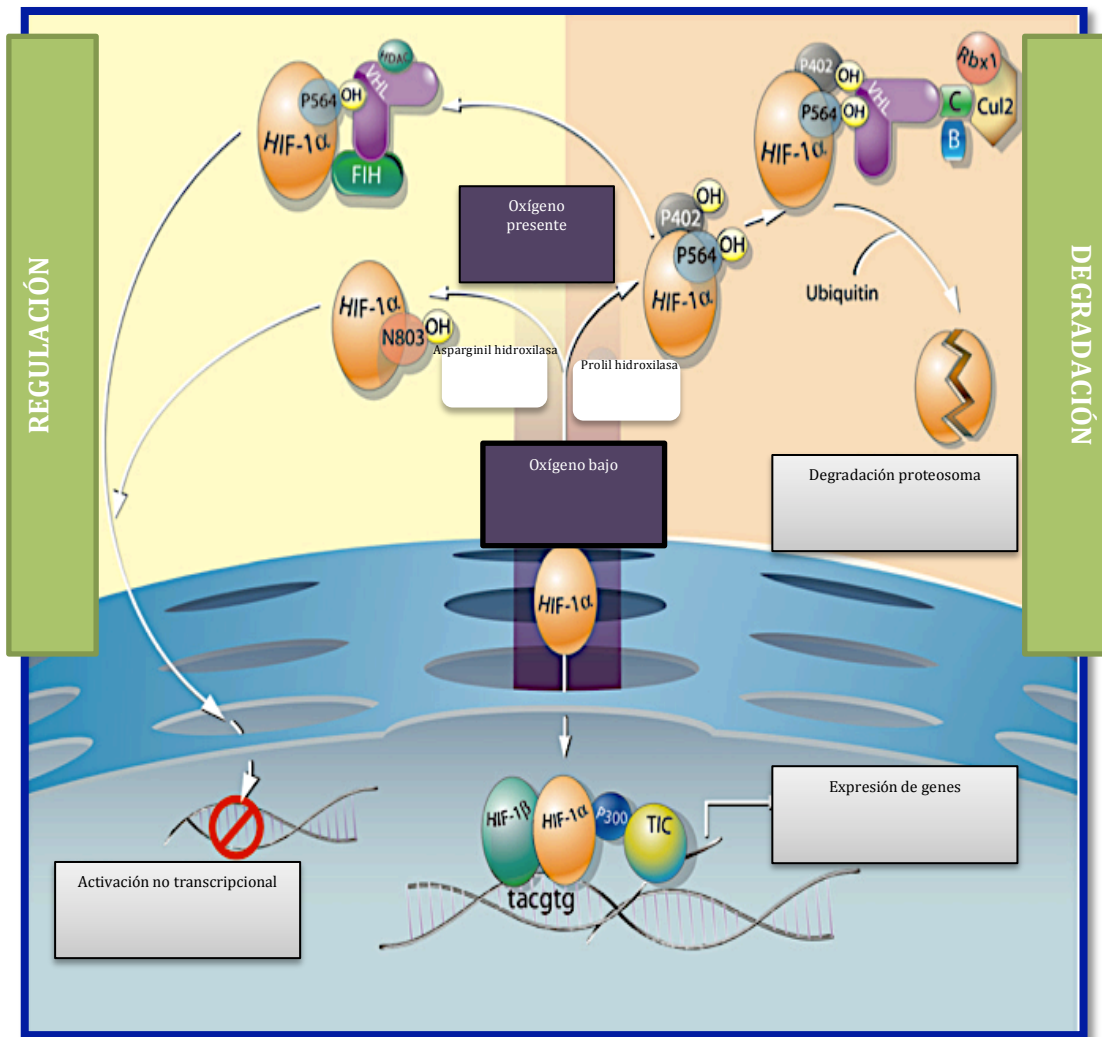
La subunidad 1 β , es una proteína de 91-94 kDa (774-789aa) previamente identificada como ARNT (translocador del receptor para arilo hidrocarburos) y es la subunidad constitutiva, pues no se afectan las concentraciones de ARNm ni de proteína por hipoxia, además, no sólo dimeriza con HIF-1 α teniendo un papel importante en la señalización de hipoxia.¹²

La actividad de HIF-1 está dada por la regulación postraduccional de su componente inducible HIF-1 α y es un proceso de múltiples pasos regulado por los cambios de oxígeno.

La activación del factor inducible en hipoxia 1 α (HIF- 1 α) durante la hipoxia, es estabilizado y traslocado al núcleo. Al igual que otras proteínas, HIF-1 α necesita ser fosforilada para su activación, su fosforilación se efectúa en los residuos de prolina (P402, P564) y asparagina (N803), permitiendo que la subunidad α sea traslocada al núcleo gracias a la participación de dos NLS (secuencia localizadora de nucleótidos) localizados, uno en el dominio básico hélice-bucle-hélice y el otro en el extremo C-terminal de la proteína, que es decisiva para su importación al núcleo. Una vez

traslocada la subunidad α dimeriza con β y sufre un cambio conformacional que le permite la unión a los elementos responsables de hipoxia (HER), posteriormente se le une el coactivador p300/CBP119 dándose la transcripción de los genes.¹²

La degradación del factor inducible en hipoxia 1α (HIF- 1α), es realizada rápidamente por hidroxilación por prolil hidroxilasas dependientes de oxígeno y de hierro en dos residuos de prolina (P402 y P564) ubicados en el dominio de degradación dependiente de oxígeno, lo que permite la unión de la proteína von Hippel-Lindau (VHL) formando parte del complejo E3 ubiquitin-ligasa, provocando su ubiquitinación. Adicionalmente, existe una acetilación de un residuo de lisina el K532 por una acetiltransferasa llamada arrest-defective-1 (ARD1), con lo que se favorece la interacción de la subunidad α con la proteína von Hippel-Lindau. Otra hidroxilación que sufre la proteína es en un residuo de asparagina, el Asn 803, ubicada en el dominio transactivador dada por una asparaginil hidroxilasa conocido como factor inhibidor de HIF-1 (FIH-1), que es un silenciador de la transactivación, pues evita la unión a su coactivador CBP/p300.¹²
(Ver dibujo)



40

HIF-1 α : Factor inducible en hipoxia-1 α
 VHL: proteína von Hippel- Lindau
 TIC: Complejo iniciación transcripción

El rol del factor inducible de hipoxia en diferentes patologías

Actualmente, en el asma, no se ha descrito una correlación histopatológica definitiva entre los cambios en la vasculatura de la vía aérea y el grado de gravedad clínica, aunque existe cierta evidencia de cambios en el FEV1 que correlacionan con la vascularidad de la vía aérea.³ Así mismo, existen también estudios que reportan incremento del número de vasos bronquiales en casos fatales de asma y particularmente en aquellos casos de asma grave dependiente de esteroides, lo cual podría indicar también que la angiogénesis y la remodelación vascular pudiesen

depender de estímulos proangiogénicos no inflamatorios en el asma crónica tales como los factores inducibles en hipoxia antes mencionados.¹³

A pesar de que en el asma se tiene bien caracterizada la hipoxia, no fue sino hasta el 2006 cuando se publicó el primer reporte donde se concluyó que HIF-1 α y HIF-2 α se encuentran elevados en biopsias obtenidas por broncoscopia de pacientes asmáticos, en comparación con los controles, así como la asociación entre el factor de crecimiento del endotelio vascular con la expresión de ambas isoformas de HIF. Sin embargo, la participación de este factor de transcripción en la fisiopatogenia del asma no se ha dilucidado por completo, como tampoco la implicación de las moléculas participantes en el proceso inflamatorio y en la remodelación. Los estudios sugieren que HIF-1 participa de forma importante en la fisiopatogenia del asma, pero no se conoce a profundidad el tema. El papel potencial de estos factores desempeñan en el desarrollo y la progresión del asma sigue siendo en gran parte desconocida.²¹

La sobreexpresión de HIF-1 α y HIF-2 α ha sido encontrado en diversas patologías, por ejemplo en neoplasias malignas humanas, probablemente como consecuencia de la hipoxia intratumoral o alteración genética. El interior de la masa tumoral llega a ser progresivamente hipóxica a medida que aumenta su tamaño hasta que incrementa la angiogénesis por los tumores. Estas condiciones hipóxicas dentro de los tumores pueden producir un aumento de la estabilidad y la actividad de HIF-1 α . Los análisis inmunohistoquímicos demostraron que hay niveles detectables de la proteína HIF-1 α en tumores benignos, niveles elevados en tumores malignos primarios, y una cantidad marcada en las metástasis tumorales, en contraste con su ausencia en tejidos normales. La expresión de los genes diana del HIF es generalmente consistente con los niveles de HIF-1 α .¹⁴

Hay una frecuencia notable de alteraciones genéticas comunes en las células cancerosas asociadas con el aumento de la expresión HIF-1 α , pareciendo que la sobreexpresión de HIF-1 α confiere ventajas selectivas a las células tumorales. Existe una correlación entre la sobreexpresión de HIF-1 y la mortalidad de los pacientes, mal pronóstico y de resistencia al tratamiento.^{15, 16}

Así mismo, la activación de la actividad de HIF también se ha demostrado en una amplia gama de respuestas fisiológica a condiciones isquémicas, hipóxicas e inflamatorias, en donde juega un papel en la reparación de los órganos o tejidos. Por ejemplo, los niveles de HIF-1 y VEGF se incrementaron en el miocardio cuando los pacientes desarrollaron oclusión aguda de la arteria coronaria aguda. La remodelación vascular eficaz después de la lesión isquémica depende de un programa integrado de

la expresión génica dependiente de HIF-1. Además, la inducción de HIF-1 y sus genes diana se ha demostrado en la placenta de pacientes con preeclampsia, en la retina isquémica, así como de la cicatrización de heridas.^{17, 18, 19, 20}

Hoshino et al ²⁹ informó de que la expresión de VEGF en las vías respiratorias se correlacionó con el grado de angiogénesis y a su vez con la inflamación.

Estos hallazgos sugieren que la producción excesiva de VEGF en las vías respiratorias asmáticas contribuye a la infiltración de células inflamatorias.

En un estudio por Lee et al²⁸, se demostró que la expresión de VEGF fue incrementado en las vías respiratorias de los pacientes asmáticos en comparación con los sujetos control , y que correlaciona con el grado de inflamación de las vías respiratorias en pacientes asmáticos. Los hallazgos de este estudio fueron que la expresión de HIF-1 y HIF-2 fue mayor en los pacientes asmáticos que en los controles y que existe una correlación significativa entre VEGF y HIF en pacientes asmáticos. Siendo este el primer artículo, que describió la expresión de HIF en pacientes asmáticos.²⁸

Se ha reconocido que la mucosa respiratoria es edematosa y contiene vasos sanguíneos dilatados incluso en el asma leve. Recientemente, se informó de que el número y porcentaje de los vasos sanguíneos están incrementados en las muestras de biopsia de pacientes asmáticos en comparación con sujetos control. Lo que se traduce en el aumento en el número y capacidad vascular, con engrosamiento de la pared mucosa de las vías respiratorias, que pueden llevar a un estrechamiento de las mismas. El nivel de factor de crecimiento endotelial vascular en pacientes asmáticos fue significativamente mayor que la de los controles. Dicho factor puede ser producido por una variedad de células humanas, incluyendo las células vasculares de músculo liso, queratinocitos, células epiteliales, macrófagos y eosinófilos; se une a los receptores de superficie celular de alta afinidad, flt- 1 (Vascular endothelial growth factor receptor 1) y KDR/flk-1 , que se expresa predominantemente en las células endoteliales.

El factor de crecimiento vascular endotelial amplifica la permeabilidad microvascular y es uno de los inductores más potentes de la proliferación de células endoteliales.²⁸

III. ANTECEDENTES

La activación del Factor inducible en hipoxia (HIF) se ha demostrado en una amplia gama de respuestas fisiológica a condiciones isquémicas, hipóxicas e inflamatorias, en donde juega un papel fundamental para responder a los daños a órganos o tejidos. Por ejemplo, los niveles de HIF-1 y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se incrementaron en el miocardio cuando los pacientes desarrollaron oclusión aguda de la arteria coronaria aguda. La remodelación vascular eficaz después de la lesión isquémica depende de un programa integrado de la expresión génica dependiente de HIF-1. Además, la inducción de HIF-1 y sus genes diana se ha demostrado en la placenta de pacientes con preeclampsia, en la retina isquémica, así como de la cicatrización de heridas.^{17, 18, 19, 20}

Hoshino et al ²⁹ informó de que la expresión de VEGF en las vías respiratorias se correlacionó con el grado de angiogénesis y a su vez con la inflamación. Estos hallazgos sugieren que la producción excesiva de VEGF en las vías respiratorias de pacientes con asma contribuye a la infiltración de células inflamatorias.

En un estudio por Lee et al²⁸, se demostró que la expresión de VEGF esta incrementado en las vías respiratorias de los pacientes asmáticos en comparación con los sujetos control , y correlaciona con el grado de inflamación de las vías respiratorias de los asmáticos. Los hallazgos de este estudio fueron que la expresión de HIF-1 y HIF-2 fue mayor en los pacientes asmáticos y que existe una correlación significativa entre VEGF y HIF en los sujetos del estudio.²⁸

Sabemos que el número y porcentaje de los vasos sanguíneos están incrementados en las muestras de biopsia de pacientes asmáticos en comparación con sujetos control. Implicando que el aumento de número, la ampliación vascular y engrosamiento consiguiente de la pared mucosa de las vías respiratorias pueden llevar a un estrechamiento de la luz de las vías respiratorias. El nivel de factor de crecimiento endotelial vascular en asmáticos fue significativamente mayor que en los no asmáticos. El factor de crecimiento endotelial vascular puede ser producido por una variedad de células humanas, incluyendo las células vasculares de músculo liso, queratinocitos, células epiteliales, macrófagos y eosinófilos; se une a los receptores de superficie celular de alta afinidad, flt- 1 (Vascular endothelial growth factor receptor 1) y KDR/flk-1, expresado predominantemente en las células endoteliales. El VEGF amplifica la permeabilidad microvascular y es uno de los inductores más potentes de la proliferación de células endoteliales.²⁷

En el estudio de Huerta- Yopez et al³⁰, fueron examinados ratones modificados genéticamente para no expresar el gen del HIF- 1 β para valorar su habilidad de montar respuesta inflamatoria alérgica en el pulmón posterior a exposición a ovoalbúmina, midiendo así mismo niveles de HIF-1 α en biopsias endobronquiales y secreción bronquial en pacientes con asma y secreción nasal en pacientes con rinitis después de reto, dando como resultado disminución de la respuesta inflamatoria alérgica y producción de IgE e IgE específica para ovoalbúmina. Los niveles de HIF-1 α y VEGF se incrementaron en el tejido pulmonar y secreción bronquial en pacientes con asma y en la secreción nasal de pacientes con rinitis posterior al reto.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En nuestro país el asma tiene una prevalencia en niños de entre el 6-12% y en los últimos estudios epidemiológicos se ha mostrado una tendencia a la alza, especialmente en el grupo de escolares, por lo que es considerado un problema de salud pública.

La característica fisiopatológica principal del asma es la persistencia de inflamación crónica de la vía aérea condicionando la remodelación tisular, incluso en los pacientes que tienen control de los síntomas, y esta lesión del tejido bronquial no es detenida ni revertida por los tratamientos farmacológicos.

Recientes estudios, han demostrado que el factor de transcripción HIF-1 α tiene un papel muy importante en la fisiopatogenia de la inflamación alérgica pulmonar y que su expresión correlaciona con el grado de gravedad de la enfermedad.

La expresión de HIF-1 α y VEGF incrementa en pacientes alérgicos adultos después de la exposición al alérgeno, por lo que creemos que el HIF-1 α tiene un papel preponderante en el asma. Sin embargo, se desconoce como se expresa este factor en los pacientes asmáticos pediátricos, tanto en estado crónico como agudo.

Por ello, nuestro interés se centra en evaluar la expresión del factor de transcripción inducible en hipoxia 1 (HIF-1 α) en pacientes pediátricos con asma, Para poder determinar si existe correlación entre la elevación de este factor de transcripción y la gravedad tanto del asma crónica como de la aguda, y de tal modo ser un biomarcador de gravedad.

V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el porcentaje de expresión del factor de transcripción inducible en hipoxia- 1 α en células monucleares de sangre periférica, en pacientes con asma y en crisis asmática en comparación con pacientes sanos en población pediátrica?

VI. JUSTIFICACIÓN

Actualmente los tratamientos del asma mantienen el control de los síntomas, sin embargo no revierten ni previenen la respuesta inflamatoria tisular que induce cambios estructurales del tejido bronquial conocidos como remodelación pulmonar.

Describir si existe o no aumento del HIF-1 α en pacientes asmáticos en distintas situaciones clínicas y gravedades ayudará a comprender mejor la fisiopatogénesis de esta en pacientes pediátricos, con un método de determinación poco invasivo y técnicamente factible, como lo es la obtención en sangre periférica. Dando lugar a la posibilidad de plantear en un futuro nuevos factores pronósticos o blancos terapéuticos.

VII. OBJETIVOS

General:

- Determinar la expresión del factor de transcripción HIF-1 α en células mononucleares de muestras de sangre periférica de pacientes pediátricos sanos, con asma y en crisis asmática, independientemente de la gravedad.

VIII. HIPOTESIS

El porcentaje de expresión del factor de transcripción inducible en hipoxia-1 α en células mononucleares de sangre periférica esta doblemente incrementado en pacientes con asma y crisis de asma en comparación con pacientes sanos pediátricos.

IX. MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio prospectivo, descriptivo, transversal y comparativo.

Se invito a participar a pacientes con asma del servicio de Alergia e Inmunología del Hospital Infantil de México, así como a niños de la escuela primaria y secundaria aledañas a la zona.

Se incluyeron los pacientes que tenían diagnóstico médico de Asma con una evolución mayor de un año y una prueba de reversibilidad positiva durante la evolución de su enfermedad. Se excluyeron los pacientes que usaban más de una vez a la semana beta dos agonistas, esteroides inhalados o sistémicos tres meses antes, con procesos de infección respiratorios, con tabaquismo pasivo o activo.

Del grupo de crisis asmática, se incluyeron pacientes con diagnóstico previo de Asma, que en el momento de su ingreso al estudio cursaban con crisis asmática según los parámetros clínicos, y se clasificaron según GINA 2011.

Todos los pacientes después de firmar la carta de consentimiento (tutores) y asentimiento, fueron sometidos a una historia clínica completa y dirigida con respecto a sus síntomas actuales, y a la toma de muestra sanguínea. (Ver anexo)

CRITERIOS DE INCLUSION Y DE EXCLUSION

Criterios de Inclusión

Grupo sin asma

- Pacientes de 6 a 17 años de edad sanos.

Grupo con asma y crisis asmática

- Pacientes de 6 a 17 años de edad con diagnóstico de asma de cualquier gravedad.
- Cursando con criterios clínicos de crisis asmática de cualquier gravedad.

Criterios de Exclusión

- Pacientes con diagnóstico de otra enfermedad pulmonar.
- Administración de esteroides inhalados o sistémicos tres meses antes.
- Con procesos de infección respiratoria aguda en el momento de toma de muestra sanguínea.

- Pacientes con exposición de humo de tabaco pasivo o activo.

Las muestras fueron enviadas a la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas para su procesamiento.

Purificación de células de sangre periférica y preparación de laminillas.

La purificación de células mononucleares (CMN) de sangre periférica se realizara mediante la técnica de separación por gradiente, por centrifugación; empleando Ficoll-Paque™ PLUS (Ficoll-Paque™ PLUS, GE Healthcare, sweden). Con las células purificadas se prepararan laminilla con 10,000 células/ μ L. Este valor se multiplicara por el número de laminillas (Portaobjetos para microscopio esmerilados 25x75mm, Madesa® México) que se podrán preparar y se añadirá el PBS 1X suficiente para su preparación (10×10^3 células en 100 μ l).

Ensayo de inmunocitoquímica

Con la finalidad de disminuir las variaciones entre experimentos, la reacción para la proteína HIF-1 α , se realizo en un solo tiempo para todos los grupos. Se realizo la recuperación del antígeno por citrato de sodio (0.01 M pH 6.0) y se calentó a ebullición en baño maría por 20 minutos. Se elimino la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% 3 veces por 10 minutos. Se bloqueo la unión inespecífica de los anticuerpos al tejido, mediante el uso de suero normal de cerdo al 2% en PBS 1X.

Posteriormente, las secciones se incubaran toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal anti-HIF-1 α . Después de lavar las secciones de tejido se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado a biotina y posteriormente con streptavidina conjugada a HRP , por último el color se genero mediante la adición del substrato diamino benzidina (DAB) 2 minutos; la reacción se paro con agua y las células se contrateñeron con hematoxilina. Finalmente las células se deshidratarón y montarón con resina. Las laminillas se analizaron en un microscopio (Olimpus, BX-40) y las células positivas (color café) se cuantificaron en 4 campo por cada laminilla, utilizando un analizador de imágenes (Image-Pro Plus®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD.USA).

IMPLICACIONES ÉTICAS

Se solicitó el consentimiento y asentimiento informado a los pacientes que sean incluidos en el estudio.

El presente estudio cumple con lo estipulado en el título segundo del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud. Según esta ley vigente el estudio corresponde a la categoría I (Investigación con riesgo mínimo) ya que no representa riesgos agregados a la salud, la información obtenida de los pacientes durante el estudio será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores participantes.

XI. ANALISIS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Se elaborará una base de datos en el programa de software SPSS versión 16.0.

Se realizó estadística descriptiva obteniendo medidas de tendencia central como la media, desviación estándar, error estándar, frecuencia e Intervalos de Confianza 95% (IC95%) en el programa SPSS versión 16. Se analizó por ANOVA corregido Post HOCK para análisis de multivariado, tres grupos (asma, crisis asmática y Sanos) y T de Student de muestras independientes para evaluar grupos (asmáticos vs sanos), con un nivel de significancia de 0.001.

XII. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLES INDEPENDIENTES

Edad: Variable cuantitativa discreta.

Definición conceptual: Número de meses o años de vida desde el nacimiento hasta el inicio del estudio.

Definición operacional: Número de meses o años de vida del paciente desde el nacimiento hasta su ingreso al hospital.

Unidad de medida: años

Género: Variable cualitativa nominal.

Definición conceptual: referente al fenotipo de una persona.

Definición operacional: dicotómica de acuerdo al fenotipo masculino o femenino.

Unidad de medida: masculino y femenino.

Asma: Variable cualitativa

Definición conceptual: Enfermedad inflamación crónica de las vías aéreas inferiores, manifestándose con sibilancias, disnea, opresión torácica y tos. Con limitación del flujo aéreo.

Definición operacional: Enfermedad inflamación crónica de las vías aéreas inferiores, manifestándose con sibilancias, disnea, opresión torácica y tos. Con limitación del flujo aéreo.

Escala de medición: Clasificación de asma en leve intermitente, leve persistente, moderada persistente, grave persistente de acuerdo a GINA 2006.

Unidad de medida: dicotómica

Crisis asmática: Variable cualitativa.

Definición conceptual: Episodio caracterizados por un incremento de los síntomas respiratorios y disminución progresiva de la función pulmonar que representa un cambio del estado usual del paciente.

Definición operacional: Episodio caracterizados por un incremento de los síntomas respiratorios y disminución progresiva de la función pulmonar que representa un cambio del estado usual del paciente.

Escala de medición: Clasificación de crisis asmática en leve, moderada y grave según GINA 2011.

Unidad de medida: dicotómica.

VARIABLES DEPENDIENTES

Expresión de HIF- 1 α : Variable cuantitativa

Definición conceptual: Factor de transcripción que se expresa en situaciones de hipoxia.

Definición operacional: Porcentaje de factor de transcripción que se expresa en situaciones de hipoxia.

Escala de medición: porcentaje de número de células positivas para HIF-1 α

Unidad de medida: porcentaje.

Expresión de HIF-1 α nuclear: Variable cuantitativa

Definición conceptual: Factor de expresión del factor inducible en hipoxia en núcleo.

Definición operacional: Porcentaje de expresión del factor inducible en hipoxia en núcleo.

Escala de medición: porcentaje de número de células nucleo- positivas para HIF-1

Unidad de medida: porcentaje.

XIII. RESULTADOS

Fueron seleccionados 133 pacientes, 53 escolares y adolescentes del departamento de Alergia e Inmunología con diagnóstico de Asma, y a 27 pacientes con crisis asmática que acudían al Hospital Infantil de México; y 53 sujetos sanos.

Del grupo de los asmáticos en base a los criterios de GINA de 2006, se clasificaron según gravedad, 34 tuvieron Asma intermitente, 19 asma leve persistente.

Del grupo de asma aguda, 20 pacientes con crisis leve, 5 pacientes con crisis moderada y 2 con crisis grave.

De los 133 pacientes estudiados, la edad media en años y desviación estándar (DS) del grupo de asma fue de 12.2 (\pm 2.0), grupo crisis asmática 9.5 (\pm 2.9) y grupo de pacientes sanos de 12.0 (\pm 1.5) años.

Con distribución por género de manera semejante en los grupos, con 73 pacientes masculinos y 60 femeninos distribuidos entre los grupos, sin presentar diferencia estadística significativa entre ellos. (Ver Anexos Tabla 1)

Tanto en la expresión del HIF- 1 α como HIF nuclear hubo diferencia significativa en los tres grupos, pacientes con asma, pacientes con crisis asmática y grupo de pacientes sanos, con una $p < 0.0001$ (IC95%). (Ver Anexos Tabla 2)

Se analizó por ANOVA corregido Post HOCK para análisis entre los tres grupos con una significancia de 0.05.

Con una expresión del HIF- 1 α en el grupo control con una media de expresión del 21.4% (IC 95% 16.83- 25.97), en el grupo de Asma con media de 63.53% (IC 95% 57.49- 69.56) y en el grupo de crisis asmática con media de 96.91% (IC 94.67- 99.15). (Ver Anexos. Grafica I)

En cuanto a la expresión del HIF nuclear con una media del porcentaje de expresión en el grupo control de 2.83% (IC 95% 1.60- 4.06), del grupo de Asma 5.85% (IC 95% 3.92- 7.78) y del grupo de pacientes con crisis asmática del 33.65% (IC 95% 25.56- 41-73). (Ver Anexos. Grafica I)

No se encontró diferencia significativa entre el porcentaje de expresión del factor de transcripción HIF- 1 α entre asma intermitente y leve persistente.

Así como tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa en la expresión del factor de transcripción entre el mismo grupo de asma y en el de crisis asmáticas.

XIV. DISCUSIÓN

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de la vía aérea, que como se describió desde hace más de 90 años por Huber y Koessler³ tiene una fisiopatología que comprende cambios estructurales de la vía aérea, dados por la participación de varias células y mediadores inflamatorios, confiriendo transformación en la composición y organización del tejido.

La remodelación de la vía aérea en el asma involucra cambios morfológicos característicos, con sobre-regulación de factores de crecimiento y citocinas, dados por una expresión incrementada de factores de transcripción propios de estos estados de lesión.

El papel de la angiogénesis es preponderante, con un incremento anormal del número y tamaño de los microvasos en el tejido bronquial con remodelamiento tisular. Existe una expresión a la alta del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) que media estos cambios, y en estudios recientes con el factor de transcripción inducible en hipoxia- 1 α (HIF- 1 α).

Los primeros reportes de la expresión de este factor de transcripción en asma, se realizaron en estudios de modelos experimentales de sensibilización alérgica en muestras de tejido bronquial, estimándose tanto en ratones sanos como en aquellos con inflamación alérgica inducida, en estos últimos se demostró un incremento del HIF- 1 α en las células del epitelio bronquial.³¹

En un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar, se demostró que la expresión de HIF-1 α se correlaciono con la expresión de quimiocinas que participan en la remodelación tisular del asma.³²

Estos resultados, motivaron al estudio de este factor de transcripción (HIF- 1 α) en humanos, en biopsias bronquiales de pacientes adultos con asma. En el 2006 Lee et al, concluyó que HIF-1 α y HIF-2 α se encuentran elevados en biopsias obtenidas por broncoscopia de pacientes asmáticos en comparación con los controles, con una importante correlación con el factor de crecimiento del endotelio vascular, que se relaciona con la remodelación de la vía aérea.

Varios estudios han reportado un inicio temprano de la remodelación de la vía aérea, si bien no hay una clara evidencia de cuando esto ocurre.^{23, 33} Si el proceso inflamatorio inicia de forma temprana y no es controlado de manera eficiente, esta remodelación puede condicionar a una disminución de la función pulmonar, con

limitación fija del flujo aéreo, condición cada vez más frecuente en pacientes con asma.

En nuestro estudio, se incluyeron pacientes pediátricos asmáticos y sanos como control, con una media de edad de 12 años, en estos se analizó la expresión del factor inducible en hipoxia- 1 α , que a diferencia de lo reportado previamente, se realizó la determinación por medio de inmunocitoquímica en células mononucleares de muestra de sangre periférica.

En estudios previos en pacientes con asma^{28, 29, 30, 39} la estimación de este factor de transcripción, se realizaba en tejido bronquial obtenido por medio de broncoscopia, la cual resulta una técnica invasiva y con riesgos inherentes a su realización.

Nuestro estudio muestra resultados consistentes con lo reportado en la literatura^{***}, con un incremento de la expresión de HIF- 1 α en pacientes asmáticos con una expresión referida de 63.53% (IC 95% 57.49- 69.56) con respecto a sanos 21.4% (IC 95% 16.83- 25.97).

El rol de las crisis asmáticas en la remodelación de la vía aérea se ha estudiado en los últimos años. El incremento de niveles de citocinas pro-inflamatorias y la expresión de genes que involucran la remodelación han sido revelados en muestras de biopsias de tejido bronquial de pacientes con asma después de inhalación de alérgeno.^{34, 35, 36, 37.}

El trabajo de Baek et al⁶, utilizó un modelo murino de asma inducida por alérgeno bajo condiciones de hipoxia aguda, para simular un episodio de exacerbación asmática grave, para determinar la influencia de este evento agudo en los niveles de HIF- 1 α , el cual se incrementó.

En nuestro estudio fueron ingresados pacientes pediátricos asmáticos en crisis de distintas gravedades, teniendo una determinación del factor inducible en hipoxia 1- α incrementado, de manera significativa en comparación de los pacientes con asma (no en crisis), encontrando un porcentaje de expresión de 96.91% (IC 94.67- 99.15) y 63.53% (IC 95% 57.49- 69.56) respectivamente.

Este potencial de amplificación de la expresión del HIF- 1 α que se observa en los episodios de las crisis asmáticas, es congruente con la clínica del paciente con asma y crisis, al tener mayor frecuencia y gravedad de las exacerbaciones, resulta en una mayor limitación del flujo de aire, disminución de la función pulmonar e

hiperreactividad bronquial, condiciones que son seguramente resultado de la remodelación de la vía aérea.

Los pacientes pediátricos que ingresaron al estudio tenían diferentes grados de asma, dada por la clasificación según síntomas clínicos reportados por el paciente y de funcionamiento pulmonar, de GINA 2006 (Ver anexo), lo cual favorecía para plantear la posibilidad de distinto grado de expresión del HIF- 1 α , ya que se ha observado en el asma leve una remodelación de la vía aérea³⁹ y se espera que esta remodelación sea proporcional a la duración y gravedad de la enfermedad^{22, 38}; sin embargo, dentro de los pacientes asmáticos no se encontraron diferencias significativas, por lo que se requieren de más estudios para determinar posibles diferencias de expresión entre grupos de gravedad de asma.

El grupo de pacientes con crisis asmáticas fueron clasificados según la gravedad de la crisis en base a la clasificación de GINA 2011 (Ver anexo), por síntomas clínicos reportados y hallazgos a la exploración física; dentro de este grupo de pacientes no se encontró una diferencia significativa entre la expresión del HIF- 1 α y la gravedad de la crisis, requiriendo de mayores estudios.

La expresión del HIF- 1 α nuclear, es indicativa de que existe actividad transcripcional en el núcleo celular. En los resultados de nuestro estudio se obtuvo una expresión nuclear del HIF-1 α en los pacientes del grupo control de 2.83% (IC 95% 1.60- 4.06), del grupo de asma 5.85% (IC 95% 3.92- 7.78) y del grupo de pacientes con crisis asmática del 33.65% (IC 95% 25.56- 41-73). Lo cual nos habla de una actividad incrementada en situaciones de asma y de la amplificación de esta actividad en episodios agudos.

XV. CONCLUSIONES

En las últimas dos décadas se han tenido avances significativos en el entendimiento de la patogénesis del asma. Ahora es evidente que las anomalías funcionales en los pacientes asmáticos son el resultado del remodelamiento tisular y las alteraciones estructurales que condiciona en el tejido de la vía aérea.

El factor de transcripción inducido en hipoxia $1-\alpha$ fue inicialmente estudiado en enfermedades neoplásicas, posteriormente se determinó el incremento de su expresión en otras enfermedades, entre ellas el asma, en donde su importancia como factor pro-inflamatorio radica en activación transcripcional de genes claves implicados con la remodelación de la vía aérea.³⁹

En nuestro estudio, se realizó la determinación del HIF- 1α mediante la técnica de inmunocitoquímica en células mononucleares de sangre periférica, la cual resulta en una intervención poco invasiva y técnicamente factible para la determinación de este factor en pacientes pediátricos con asma.

Concluyendo, se demostró que la expresión del factor de transcripción inducible en hipoxia- 1α y nuclear se encuentra incrementado en células mononucleares de sangre periférica en pacientes con asma y aún más incrementado en pacientes con crisis asmática comparados con pacientes sanos, sugiriendo la importancia de ese factor en la patogenia de la enfermedad, incrementando el interés por realizar otros estudios para conocer otras variables clínicas que intervengan en el incremento del porcentaje de expresión. Así como la correlación entre el porcentaje expresado y el grado de remodelación de la vía aérea en pacientes pediátricos con asma y en crisis asmática.

XVI. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	MES				
	2013		2014		
	Marzo Septiembre	Octubre- Diciembre	Enero- Febrero	Marzo- Abril	Mayo- Junio
Elección del tema	X				
Búsqueda de antecedentes	X				
Elaboración de protocolo	X				
Enlistar pacientes pediátricos con asma y sin asma, y en crisis asmática. Realizar su clasificación de la enfermedad		X	X		
Recolección de muestras de pacientes y envío a laboratorio de Investigación Enfermedades Oncológicas		X	X		
Análisis de resultados				X	X
Presentación de la información					X
Redacción de tesis					X

XVII. LIMITACIÓN DEL ESTUDIO

Se necesitan nuevos estudios con un mayor número de población para determinar la relación clínica entre los estados de gravedad del asma y las crisis asmáticas y el porcentaje de expresión de este factor de transcripción.

XVIII. REFERENCIAS

1. World Allergy Organization (WAO) White Book on Allergy, 2011.
2. Global initiative for asthma (GINA) Update 2012
http://ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_AtAGlance_2012.pdf.
3. Huber HL, Koessler KK. The pathology of bronchial asthma. *Arch Intern Med Exp* 1922;30:689-760.
4. Dirección General de Epidemiología. Anuario de Morbilidad 2011. <http://www.dgepi.salud.gob.mx>.
5. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q, Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:451-62.
6. Baek K., Cho J, Rosenthal L, Crotty LE, Nizet V, Broide DH, et al. Hypoxia potentiates allergen induction of HIF-1 α , chemokines, airway inflammation, TGF- β 1, and airway remodeling in a mouse model. *Clinical Immunology* (2013) 147, 27–37.
7. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8(5):588-94.
8. Semenza GL, Neufelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia- inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(13):5680-4.
9. Ke, Q., Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* (2006). 70:1469–1480.
10. Lisy, K., Peet, DJ. Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death and Differentiation* (2008) 15, 642–649.
11. Hu, C., et al. The N-Terminal Transactivation Domain Confers Target Gene Specificity of Hypoxia-inducible Factors HIF-1 α and HIF-2 α . *Molecular Biology of the Cell* (2007);18, 4528–4542.
12. Ke, Q., Costa, M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* (2006). 70:1469–1480.
13. Slade D, Kraft M. Airway remodeling from bench to bedside: Current perspectives. *Clin Chest Med* 2006; 27: 71–85.

14. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, and Harris AL (2000) The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 157:411–421.
15. Semenza GL (2002) Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer. *Intern Med* 41:79–83.
16. Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3:721–732.
17. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, and Thistlethwaite PA (2000) Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 342:626–633.
18. Rajakumar A, Doty K, Daftary A, Harger G, and Conrad KP (2003) Impaired oxygen-dependent reduction of HIF-1 α and -2 α proteins in pre-eclamptic placentae. *Placenta* 24:199–208.
19. Grimm C, Wenzel A, Groszer M, Mayser H, Seeliger M, Samardzija M, Bauer C, Gassmann M, and Reme CE (2002) HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med* 8:718–724.
20. Elson DA, Ryan HE, Snow JW, Johnson R, and Arbeit JM (2000) Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1 α and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing. *Cancer Res* 60: 6189 – 6195.
21. Lee KS, Min KH, Kim SR, et al. Vascular endothelial growth factor modulates matrix metalloproteinase-9 expression in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174(2):161-70.
22. Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med* 1998;339:1194-200.
23. Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Tura M, et al. Airway inflammation in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168: 798-803.
24. Saglani S, Payne DN, Zhu J, Wang Z, Nicholson AG, Bush A, et al. Early detection of airway wall remodeling and eosinophilic inflammation in preschool wheezers. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:858-64.
25. Sears MR, Greene JM, Willan AR, Wiecek EM, Taylor DR, Flannery EM, et al. A

longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood. *N Engl J Med* 2003;349:1414-22.

26. Strunk RC, Weiss ST, Yates KP, Tonascia J, Zeiger RS, Szefer SJ. Mild to moderate asthma affects lung growth in children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:1040-7.

27. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors- similar but not identical. *Mol. Cells* 29, 435-442, May 31, 2010.

28. Lee, SY, Kwon S, Kim KH, Moon HS, Song JS, Park, SH et al. Expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor in the airway of asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2006;97:794–799.

29. Hoshino M, Nakamura Y, Hamid QA. Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptor and angiogenesis in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107: 1034 –1038.

30. Huerta-Yepez S, Baay-Guzman GJ, Bebenek I. G, Hernandez-Pando R, Vega MI, Chi L, et al. Hypoxia Inducible Factor promotes murine allergic airway inflammation and is increased in asthma and rhinitis. *Allergy* 2011; 66: 909–918.

31. Ahmad T, Kumar M, Mabalirajan U, Pattnaik B, Aggarwal S, Singh A, Singh S. Hypoxia Response in Asthma Differential Modulation on Inflammation and Epithelial Injury. *American Journal of respiratory cell and molecular biology*; 47: 2012.

32. Baay- Guzmán, Hernández, A., Huerta-Yepez, S. Contribución de la hipoxia en la remodelación del tejido pulmonar en procesos asmáticos. *Revista Alergia México* 2008;55(1):18-32.

33. Le Bourgeois M, Goncalves M, Le Clainche L, Benoist MR, Fournet JC, Scheinmann P, et al. Bronchoalveolar cells in children < 3 years old with severe recurrent wheezing. *Chest* 2002;122:791-7.

34. Phipps S, Benyahia F, Ou TT, Barkans J, Robinson DS, Kay AB. Acute allergen-induced airway remodeling in atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31: 626-32.

35. Kariyawasam HH, Aizen M, Barkans J, Robinson DS, Kay AB. Remodeling and airway hyperresponsiveness but not cellular inflammation persist after allergen challenge in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:896-904.

36. Bai TR, Vonk JM, Postma DS, Boezen HM. Severe exacerbations predict excess lung function decline in asthma. *Eur Respir J* 2007;30:452-6.
37. Pauwels RA, Pedersen S, Busse WW, Tan WC, Chen YZ, Ohlsson SV, et al. Early intervention with budesonide in mild persistent asthma: a randomised, double-blind trial. *Lancet* 2003;361: 1071-6.
38. Bumbacea D, Campbell D, et al. Parameters associated with persistent airflow obstruction in chronic severe asthma. *Eur Respir J* 2004; 24:122-8.
39. Polosukhin VV, Lawson WE, Milstone AP, et al. Association of progressive structural changes in the bronchial epithelium with subepithelial fibrous remodeling: a potential role for hypoxia. *Virchows Arch* 2007;451:793–803.
- 40.. Vincent KA, Feron O, Kell RA Harnessing the Response to Tissue Hypoxia HIF-1 and Therapeutic Angiogenesis. *TCM* 2002; 12, No. 8.: 362- 367.

XIX. ANEXOS

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRAFICAS DE LOS GRUPOS

	<i>n</i>	Edad	Edad SE	Género Hombre	Mujer
AI	34	12	0.25	21	13
ALP	19	12.56	0.64	10	9
Crisis asmática	27	9.52	0.58	15	12
Control	53	12.02	0.22	27	26
Total	133	12.1	0.17	73	60

AI: Asma intermitente.

ALP: Asma leve persistente.

ES: Error estandar

TABLA 2. RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN DE HIF-1 α Y NUCLEAR

Grupo	n	Fe m	Ma s	Edad	HIF		IC95%		HIF-	IC95%	
				Años	%			n			
				Medi a	DS	Medi a	Baj o	Alt o	Medi a	Baj o	Alt o
Control	53	26	27	12.08	1.59 1	21.40	16.83	25.97	2.83	1.60	4.06
Asma	53	22	31	12.21	2.02 3	63.53	57.49	69.56	5.85	3.92	7.78
Crisis asmática	27	12	15	9.52	2.95 3	96.91	94.67	99.15	33.65	25.56	41.73

*P<0.05 Chi2 edad Crisis asmática vs control y Asma
 Entre los tres grupos P<0.05 ANOVA POST HOCK
 Control vs Crisis asmática y Asma
 Crisis asmática vs Asma

GRAFICA I. COMPARACIÓN DE VALORES E INTERVALOS DE CONFIANZA ENTRE LOS GRUPOS

Comparación de los valores medios e intervalos de confianza de la expresión de HIF y HIFnuclear en tres grupos de niños

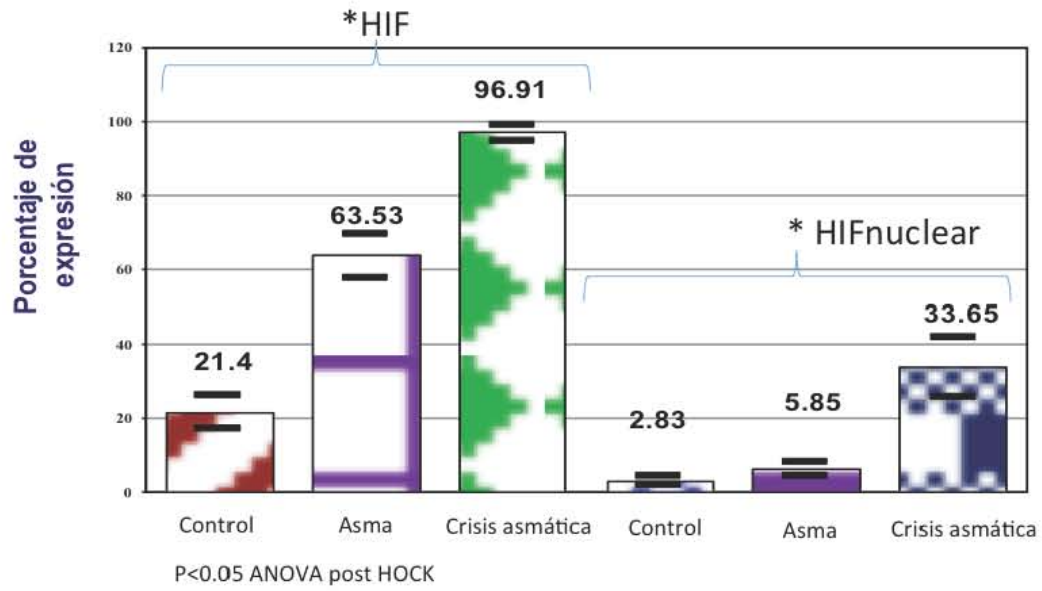
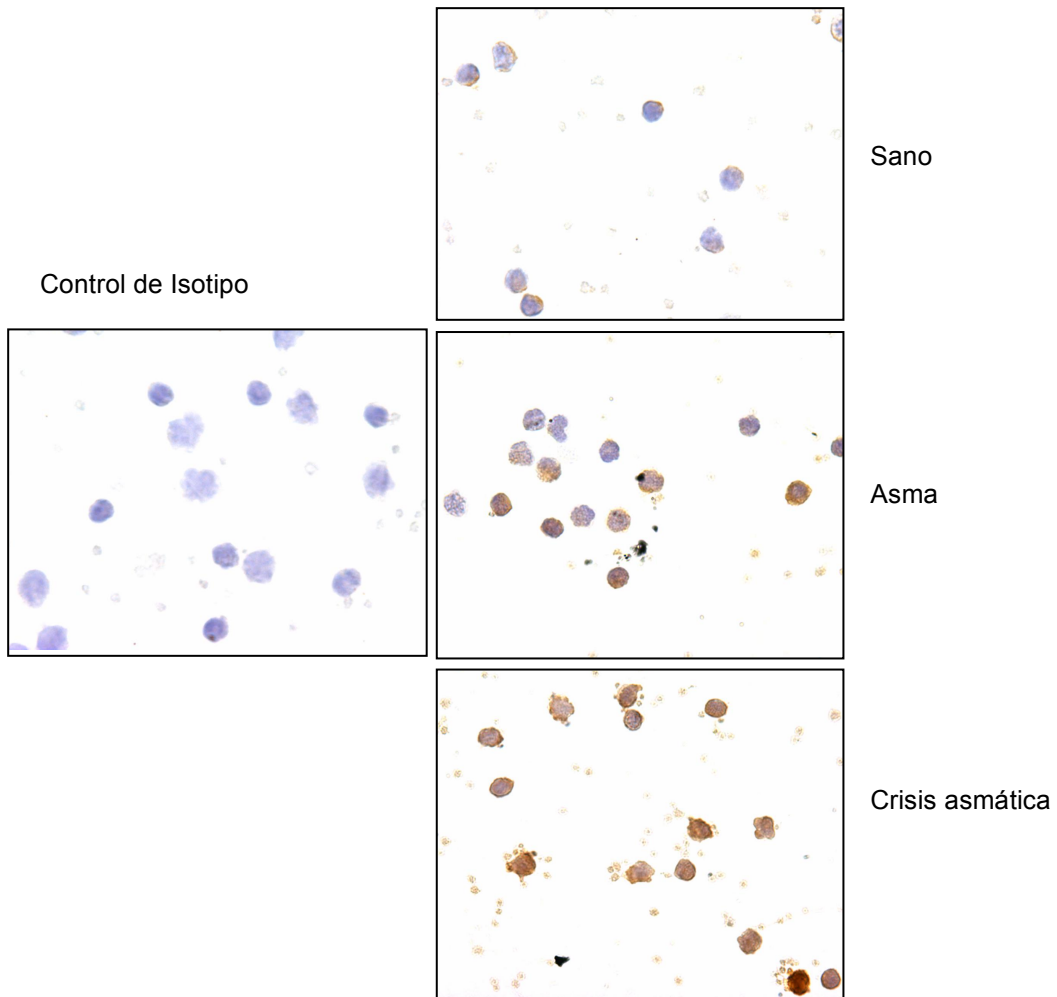


IMAGEN I. EXPRESIÓN DE FACTOR INDUCIBLE EN HIPOXIA- $I\alpha$



CLASIFICACIÓN DE GRAVEDAD DE ASMA GINA 2006₂

Intermitente	Leve persistente	Moderada persistente	Grave persistente
Síntomas <1 vez/semana	Síntomas >1 vez/semana	Síntomas diarios Uso diario β 2 agonista	Síntomas diarios
Exacerbaciones de corta duración	Exacerbaciones pueden afectar actividad y sueño	Exacerbaciones afectan actividad y sueño	Exacerbaciones frecuentes Limita actividad física
Síntomas nocturnos \leq 2 veces/ mes	Síntomas nocturnos >2 veces/mes	Síntomas nocturnos >1 vez/semana	Síntomas de asma frecuentes
FEV ₁ o PEF \geq 80% del predicho Variabilidad <20%	FEV ₁ o PEF \geq 80% del predicho Variabilidad 20%-30%	FEV ₁ o PEF 60-80% del predicho Variabilidad >30%	FEV ₁ o PEF \leq 60% del predicho Variabilidad >30%

CLASIFICACIÓN DE CRISIS ASMÁTICA GINA 2011₂

Gravedad	Leve	Moderada	Grave	Paro Inminente
Falta de aliento	Camina Puede sentarse	Hablando/Llanto corto Sentado	En reposo, sin alimentarse Inclinado	
Habla	Oraciones	Frasas	Palabras	
Alerta	Puede estar agitado	Usualmente agitado	Usualmente agitado	Mareado o confundido
Respiración	Incrementada	Incrementada	>30/min	<2meses <60 2-12m <50 1-5 a <40 6-8 ^a >30
Músculos accesorios	Usualmente no	Usualmente	Usualmente	Disociación toracoabdominal
Sibilancia	Moderadas	Fuertes	Usualmente fuertes	Ausencia
Pulso/min	<100	100-120	>120	Bradicardia
Pulso Paradójico	Ausente	10-25mmHg	20.40mmHg	Su ausencia sugiere fatiga músculos accesorios
PEF luego de broncodilatador	>80%	60-80%	<60% Respuesta <2hrs	
PaO ₂	Normal	>60mmHg	<60mmHg/ Cianosis	
PaCO ₂	<45mmHg	<45mmHg	>45mmHg	
SaO ₂	>95%	91-95%	<90%	
La hipo ventilación se desarrolla mas rápidamente en menores que en adolescentes y adultos				
La presencia de varios parámetros, aunque no todos, indica la clasificación				

Carta de consentimiento informado para pacientes



Proyecto de investigación:

Determinación de la expresión del Factor Inducible en Hipoxia- 1 α en células mononucleares de sangre periférica en pacientes pediátricos con Asma, en crisis asmática y sanos

Estimado madre y/o padre:

Por medio de esta carta, lo invitamos a participar en el estudio mencionado arriba, ya que su hijo(a) tiene diagnóstico de asma. Usted debe saber que la participación en esta investigación es totalmente voluntaria, de manera que usted puede decidir no participar en mismo y en este caso no perdería ninguna prestación a la que tiene derecho en nuestro hospital.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Actualmente los tratamientos del asma mantienen el control de los síntomas, sin embargo no revierten ni previenen la respuesta inflamatoria que produce cambios estructurales del tejido bronquial conocidos como remodelación pulmonar.

Describir la expresión del HIF-1 α en pacientes con asma ayudará a comprender mejor la patología

OBJETIVO DEL ESTUDIO

La presente investigación pretende determinar la expresión del factor de transcripción HIF-1 α en sangre periférica de pacientes pediátricos con asma y en crisis asmática

Sin embargo, los procedimientos que se realizan en este estudio no son indispensables para el tratamiento de la condición que tiene su hijo(a).

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Para este estudio necesitamos realizarle al (la) paciente una serie de preguntas relacionadas a la evolución de su enfermedad y un examen físico completo. Además, se le tomará una muestra de sangre.

Las muestras serán obtenidas mediante el siguiente procedimiento:

Obtención de la muestra sanguínea.

1. Se explica detalladamente el procedimiento al paciente y/o familiar.
2. Bajo condiciones higiénicas óptimas, se coloca el brazo extendido y se selecciona la vena por palpación preferentemente en el antebrazo.
3. Mediante tubo con anticoagulante.
4. La muestra sanguínea será almacenada a temperatura ambiente para su análisis posterior.

RIESGOS Y MOLESTIAS

Los posibles riesgos de la toma de muestra sanguínea son molestia leve en el sitio de punción, formación de moretones, hemorragia, infección o cicatriz.

BENEFICIOS

Su colaboración permitirá obtener conocimiento de la expresión de ese factor de transcripción, para posibles marcadores de la enfermedad o tratamientos en el futuro. Debido a que la información que se recabe es absolutamente confidencial y con fines de investigación, usted debe saber que no daremos a conocer ninguna información acerca de su hija(o), sin su consentimiento.

COSTOS

La toma de muestras de sangre, así como cualquier consulta que usted tenga con el médico para hablar del estudio de investigación no tendrán ningún costo.

Usted tiene la garantía de **recibir respuesta a sus preguntas y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación**. Además, en caso de aceptar de participar en el protocolo usted puede dejar de hacerlo en cualquier momento durante la realización del mismo, sin que se vea afectado su derecho de recibir atención en nuestra institución.

Por este medio, _____ otorgo mi consentimiento para participar en el estudio, sin que haya de por medio coerción alguna.

México, D.F. a _____ de _____ de _____

Nombre y firma de la Madre

Nombre y firma del Padre

Nombre y firma de testigo 1

Parentesco con el paciente

Nombre y firma de testigo 2

Parentesco con el paciente

Nombre y firma del investigador

Responsable

Carta de consentimiento informado para pacientes



Proyecto de investigación:

Determinación de la expresión del Factor Inducible en Hipoxia- 1 α en células mononucleares de sangre periférica en pacientes pediátricos con Asma, en crisis asmática y sanos

Estimado madre y/o padre:

Por medio de esta carta, lo invitamos a participar en el estudio mencionado arriba, ya que su hijo(a) tiene diagnóstico de asma. Usted debe saber que la participación en esta investigación es totalmente voluntaria, de manera que usted puede decidir no participar en mismo y en este caso no perdería ninguna prestación a la que tiene derecho en nuestro hospital.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Actualmente los tratamientos del asma mantienen el control de los síntomas, sin embargo no revierten ni previenen la respuesta inflamatoria que produce cambios estructurales del tejido bronquial conocidos como remodelación pulmonar.

Describir la expresión del HIF-1 α en pacientes con asma ayudará a comprender mejor la patología

OBJETIVO DEL ESTUDIO

La presente investigación pretende determinar la expresión del factor de transcripción HIF-1 α en sangre periférica de pacientes pediátricos con asma y en crisis asmática

Sin embargo, los procedimientos que se realizan en este estudio no son indispensables para el tratamiento de la condición que tiene su hijo(a).

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Para este estudio necesitamos realizarle al (la) paciente una serie de preguntas relacionadas a la evolución de su enfermedad y un examen físico completo. Además, se le tomará una muestra de sangre.

Las muestras serán obtenidas mediante el siguiente procedimiento:

Obtención de la muestra sanguínea.

1. Se explica detalladamente el procedimiento al paciente y/o familiar.
2. Bajo condiciones higiénicas óptimas, se coloca el brazo extendido y se selecciona la vena por palpación preferentemente en el antebrazo.
3. Mediante tubo con anticoagulante.
4. La muestra sanguínea será almacenada a temperatura ambiente para su análisis posterior.

RIESGOS Y MOLESTIAS

Los posibles riesgos de la toma de muestra sanguínea son molestia leve en el sitio de punción, formación de moretones, hemorragia, infección o cicatriz.

BENEFICIOS

Su colaboración permitirá obtener conocimiento de la expresión de ese factor de transcripción, para posibles marcadores de la enfermedad o tratamientos en el futuro. Debido a que la información que se recabe es absolutamente confidencial y con fines de investigación, usted debe saber que no daremos a conocer ninguna información acerca de su hija(o), sin su consentimiento.

COSTOS

La toma de muestras de sangre, así como cualquier consulta que usted tenga con el médico para hablar del estudio de investigación no tendrán ningún costo.

Usted tiene la garantía de **recibir respuesta a sus preguntas y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación**. Además, en caso de aceptar de participar en el protocolo usted puede dejar de hacerlo en cualquier momento durante la realización del mismo, sin que se vea afectado su derecho de recibir atención en nuestra institución.

Por este medio, _____ otorgo mi consentimiento para participar en el estudio, sin que haya de por medio coerción alguna.

México, D.F. a _____ de _____ de _____

Nombre y firma del paciente _____

Nombre y firma de la Madre

Nombre y firma del Padre

Nombre y firma de testigo 1

Parentesco con el paciente

Nombre y firma de testigo 2

Parentesco con el paciente

Nombre y firma del investigador

Responsable

Carta de consentimiento informado para pacientes sanos



Proyecto de investigación:

Determinación de la expresión del Factor Inducible en Hipoxia-1 α en células mononucleares de sangre periférica en pacientes pediátricos con Asma, en crisis asmática y sanos

Estimado madre y/o padre:

Por medio de esta carta, lo invitamos a participar en el estudio mencionado arriba, ya que su hijo(a) tiene diagnóstico de asma.

Usted debe saber que participar en esta investigación es totalmente voluntario, de manera que puede decidir no participar en el estudio y en este caso no perderá ninguna prestación a la que tiene derecho (en el caso de que fuera paciente de nuestro hospital).

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Actualmente los tratamientos del asma mantienen el control de los síntomas, sin embargo no revierten ni previenen la respuesta inflamatoria que produce cambios estructurales del tejido bronquial conocidos como remodelación pulmonar.

Describir la expresión del HIF-1 α en pacientes con asma ayudará a comprender mejor la patología

OBJETIVO DEL ESTUDIO

La presente investigación pretende determinar la expresión del factor de transcripción HIF-1 α en sangre periférica de pacientes pediátricos con asma y en crisis asmática

Para conocer las alteraciones en los pacientes con dicha enfermedad SE REQUIERE DE SU COMPARACION CON LO ENCONTRADO EN NIÑOS O JÓVENES SANOS, como es el caso de su hijo(a).

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Para este estudio necesitamos realizarle al (la) paciente una serie de preguntas relacionadas a la evolución de su enfermedad y un examen físico completo. Además, se le tomará una muestra de sangre.

Las muestras serán obtenidas mediante el siguiente procedimiento:

Obtención de la muestra sanguínea.

1. Se explica detalladamente el procedimiento al paciente y/o familiar.
2. Bajo condiciones higiénicas óptimas, se coloca el brazo extendido y se selecciona la vena por palpación preferentemente en el antebrazo.
3. Mediante tubo con anticoagulante, se tomarán 16ml de sangre aproximadamente.
4. La muestra sanguínea será almacenada a temperatura ambiente para su análisis posterior de las células del sistema de defensa.

RIESGOS Y MOLESTIAS

Los posibles riesgos de la toma de muestra sanguínea son molestia leve en el sitio de punción, formación de moretones, hemorragia, infección o cicatriz.

BENEFICIOS

Su colaboración permitirá obtener conocimiento de la expresión de ese factor de transcripción, para posibles marcadores de la enfermedad o tratamientos en el futuro.

MEDIANTE LA COMPARACION de su hijo(a) con lo encontrado en los pacientes

Debido a que la información que se recabe es absolutamente confidencial y con fines de investigación, usted debe saber que **no daremos a conocer ninguna información acerca de su hija(o), sin su consentimiento.**

COSTOS

La toma de muestras de sangre, así como cualquier consulta que usted tenga con el médico para hablar del estudio de investigación no tendrán ningún costo.

He leído las explicaciones acerca de este estudio y se me ha dado la oportunidad de discutir las y de hacer preguntas, las cuales han sido aclaradas en forma apropiada.

Por este medio, _____ otorgo mi consentimiento para participar en el estudio.

México, D.F. a _____ de _____ de _____

Nombre y firma de la Madre

Nombre y firma del Padre

Nombre y firma de testigo 1

Nombre y firma de testigo 2

Parentesco con el paciente

Parentesco con el paciente

Nombre y firma del investigador

Responsable

Carta de asentimiento informado para pacientes sanos



Proyecto de investigación:

Determinación de la expresión del Factor Inducible en Hipoxia- 1 α en células mononucleares de sangre periférica en pacientes pediátricos con Asma, en crisis asmática y sanos

Estimado madre y/o padre:

Por medio de esta carta, lo invitamos a participar en el estudio mencionado arriba, ya que su hijo(a) tiene diagnóstico de asma.

Usted debe saber que participar en esta investigación es totalmente voluntario, de manera que puede decidir no participar en el estudio y en este caso no perderá ninguna prestación a la que tiene derecho (en el caso de que fuera paciente de nuestro hospital).

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Actualmente los tratamientos del asma mantienen el control de los síntomas, sin embargo no revierten ni previenen la respuesta inflamatoria que produce cambios estructurales del tejido bronquial conocidos como remodelación pulmonar.

Describir la expresión del HIF-1 α en pacientes con asma ayudará a comprender mejor la patología

OBJETIVO DEL ESTUDIO

La presente investigación pretende determinar la expresión del factor de transcripción HIF-1 α en sangre periférica de pacientes pediátricos con asma y en crisis asmática

Para conocer las alteraciones en los pacientes con dicha enfermedad SE REQUIERE DE SU COMPARACION CON LO ENCONTRADO EN NIÑOS O JÓVENES SANOS, como es el caso de su hijo(a).

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Para este estudio necesitamos realizarle al (la) paciente una serie de preguntas relacionadas a la evolución de su enfermedad y un examen físico completo. Además, se le tomará una muestra de sangre.

Las muestras serán obtenidas mediante el siguiente procedimiento:

Obtención de la muestra sanguínea.

1. Se explica detalladamente el procedimiento al paciente y/o familiar.
2. Bajo condiciones higiénicas óptimas, se coloca el brazo extendido y se selecciona la vena por palpación preferentemente en el antebrazo.
3. Mediante tubo con anticoagulante, se tomarán 16ml de sangre aproximadamente.
4. La muestra sanguínea será almacenada a temperatura ambiente para su análisis posterior de las células del sistema de defensa.

RIESGOS Y MOLESTIAS

Los posibles riesgos de la toma de muestra sanguínea son molestia leve en el sitio de punción, formación de moretones, hemorragia, infección o cicatriz.

BENEFICIOS

Su colaboración permitirá obtener conocimiento de la expresión de ese factor de transcripción, para posibles marcadores de la enfermedad o tratamientos en el futuro. MEDIANTE LA COMPARACION con lo encontrado en los pacientes

Debido a que la información que se recabe es absolutamente confidencial y con fines de investigación, usted debe saber que **no daremos a conocer ninguna información, sin su consentimiento.**

COSTOS

La toma de muestras de sangre, así como cualquier consulta que usted tenga con el médico para hablar del estudio de investigación no tendrán ningún costo.

He leído las explicaciones acerca de este estudio y se me ha dado la oportunidad de discutir las y de hacer preguntas, las cuales han sido aclaradas en forma apropiada.

Por este medio, _____ otorgo mi consentimiento para participar en el estudio.

México, D.F. a _____ de _____ de _____

Nombre y firma del paciente: _____

Nombre y firma de la Madre

Nombre y firma del Padre

Nombre y firma de testigo 1

Nombre y firma de testigo 2

Parentesco con el paciente

Parentesco con el paciente

Nombre y firma del investigador

Responsable
