



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA NTPDasa-1 EN  
EOSINÓFILOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON  
ASMA ALÉRGICA**

## **TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
MARTÍNEZ ZÚÑIGA JOSÉ DE JESÚS**

### **TUTOR**

**DR. JAIME CHÁVEZ ALDERETE  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
"ISMAEL COSÍO VILLEGAS"**

### **COMITÉ TUTOR**

**DR. RICARDO LASCURÁIN LEDESMA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**DRA. CLAUDIA ISABEL ARIADNA VARGAS DOMÍNGUEZ  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
"ISMAEL COSÍO VILLEGAS"**

**CIUDAD DE MÉXICO, MAYO DE 2018**



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.

# AGRADECIMIENTOS

Me gustaría extender mis más sinceros agradecimientos a aquellos que contribuyeron para la realización de esta tesis, aportando su conocimiento tanto personal como profesional durante el transcurso de este tiempo.

Quisiera agradecer al Posgrado en Ciencias Medicas Odontológicas y de la Salud, UNAM, por permitirme continuar con mis estudios en esta importante institución; así también, agradezco al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” y al Departamento de Hiperreactividad Bronquial por brindarme el espacio para el desarrollo de este proyecto.

A mi tutor, el Dr. Jaime Chávez Alderete por su inestimable ayuda, paciencia y comprensión desde que ingrese al Instituto bajo su tutela; sus conocimientos transmitidos y pasión inherente por su trabajo me han impulsado a continuar aprendiendo y desarrollar el gusto por la investigación.

A los miembros de mi comité tutor, la Dra. Claudia Vargas Domínguez y el Dr. Ricardo Lascuráin por su guía y consejos a lo largo del desarrollo de este proyecto, así como la ayuda proporcionada para mejorar cada aspecto del mismo.

Agradezco al Dr. Ramcés Falfán Valencia por su gran ayuda para el desarrollo de este proyecto, sin el, hubiera sido mucho más difícil de lo que fué.

# DEDICATORIAS

**A mi madre**, por su apoyo incondicional y los valores inculcados que me han convertido en la persona que soy ahora y por no claudicar a pesar de las situaciones difíciles que le he hecho vivir. Estoy donde estoy gracias a ti.

**A mi abuela**, quien a pesar de ya no estar conmigo, su memoria y enseñanzas han sido fundamentales en mi desarrollo; jamás olvidare sus consejos y su bondadosa forma entender la vida. Dedico este documento especialmente para ti.

**A mis amigos**, quienes están conmigo y quienes ya no están, ya que de todos he aprendido algo y me han servido de apoyo durante todo el tiempo que llevo de conocerlos. Quienes formaron parte de mi vida y por una u otra razón ya no están.

**A mis amigos del INER** que me apoyaron durante esas largas jornadas en el laboratorio y ante la frustración que nos embarga a veces cuando los experimentos o procedimientos no salen como esperásemos. Sin duda alguna forman parte de mi vida y espero lo sigan siendo.

Gracias a todos.

*“Carpe Diem”  
“Gather ye rosebouds while ye may”*

# ÍNDICE

<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>4</b>
<b>Resumen</b>	<b>6</b>
<b>Abstract</b>	<b>8</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>10</b>
<b>1.1. Fisiopatología</b>	<b>10</b>
<b>1.2. Inmunopatología</b>	<b>12</b>
<b>1.3. Eosinófilos</b>	<b>15</b>
<b>1.4. ATP y receptores purinérgicos</b>	<b>16</b>
<b>1.5. Ectonucleotidasas</b>	<b>18</b>
<b>1.6. Esquema de tratamiento</b>	<b>21</b>
<b>1.6.1. Agonistas adrenérgicos <math>\beta</math>2</b>	<b>21</b>
<b>1.6.2. Corticoesteroides</b>	<b>22</b>
<b>1.6.3. Terapias complementarias</b>	<b>23</b>
<b>2. Justificación</b>	<b>24</b>
<b>3. Planteamiento del problema</b>	<b>24</b>
<b>4. Objetivo general</b>	<b>25</b>
<b>4.1. Objetivos específicos</b>	<b>25</b>
<b>5. Metodología</b>	<b>26</b>
<b>5.1. Criterios</b>	<b>26</b>
<b>5.2. Procesamiento de la muestra</b>	<b>27</b>
<b>5.3. Marcado magnético y separación negativa</b>	<b>27</b>
<b>5.4. Cinética enzimática</b>	<b>28</b>
<b>5.5. Conteo diferencial</b>	<b>29</b>
<b>5.6. Análisis estadístico</b>	<b>29</b>
<b>6. Resultados</b>	<b>30</b>
<b>6.1. Características generales</b>	<b>30</b>
<b>6.2. Análisis de la población celular de sangre periférica</b>	<b>30</b>
<b>6.3. Determinación del número de eosinófilos</b>	<b>31</b>
<b>6.4. Actividad de la NTPDasa-1</b>	<b>33</b>
<b>6.5. Esquema de tratamiento según el historial clínico</b>	<b>38</b>
<b>6.6. Geolocalización de pacientes</b>	<b>40</b>
<b>7. Discusión</b>	<b>42</b>
<b>8. Conclusiones</b>	<b>46</b>
<b>9. Referencias</b>	<b>47</b>

# LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas
FEV <sub>1</sub>	Volumen espiratorio forzado al 1er segundo
SaO <sub>2</sub>	Saturación de oxihemoglobina
PaCO <sub>2</sub>	Presión arterial de dióxido de carbono
PaO <sub>2</sub>	Presión arterial de oxígeno
mmHg	Milímetros de mercurio
CPA	Célula presentadora de antígenos
CMH II	Complejo principal de histocompatibilidad
T <sub>H</sub>	Linfocitos T cooperadores
IL	Interleucina
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
Ig	Inmunoglobulina
FcεRI	Receptor de alta afinidad para inmunoglobulina E
ICAM 1	Molécula de adhesión intracelular 1
VCAM 1	Molécula de adhesión vascular 1
CCL	Ligando de quimiocina
Tregs	Linfocitos T reguladores
TNF	Factor de necrosis tumoral
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
CD	Cluster de diferenciación
ATP	Adenosín trifosfato
ADP	Adenosín difosfato
AMP	Adenosín monofosfato
mM	Milimolar
NTPDasa	Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa
NF-κB	Factor nuclear kappa B
KCa <sup>2+</sup>	Canal de potasio dependiente de calcio
AP	Proteína activadora

CysLTR1	Receptor de cisteinil leucotrienos tipo 1
EDTA	Ácido etilendiamino Tetraacético
ml	Mililitro
°C	Grados Celsius
min	Minuto
rpm	Revoluciones por minuto
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NH <sub>4</sub> Cl	Cloruro de amonio
PBS	Buffer fosfato salino
BSA	Albumina de suero bovino
μL	Microlitro
KCl	Cloruro de potasio
TRIS	Tris( hidroximetil)aminometano
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	Molibdato de amonio
HCl	Ácido clorhídrico
nm	Nanómetro
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potasio
P <sub>i</sub>	Fosfato inorgánico
μM	Micromol/Micromolar
ppb	Partes por billón

# RESUMEN

El asma es una de las enfermedades con mayor prevalencia a nivel mundial, afectando principalmente a niños y ancianos, motivo por el cual se ha convertido en un problema de salud en todo el mundo. El interés por reducir la incidencia de esta patología la ha llevado a ser una de las más estudiadas y descritas por diversos grupos de trabajo, sin embargo, por su naturaleza multifactorial no hay un tratamiento definitivo para esta, y solo se ha limitado al mantenimiento y tratamiento de los síntomas característicos como la hiperreactividad, broncoespasmo e inflamación de la vía aérea.

Existe evidencia sugerente que un marcador importante en el asma es el ATP y sus nucleótidos derivados, los cuales actúan como mediadores proinflamatorios que pueden agudizar los episodios de exacerbación de la enfermedad. Estos nucleótidos son liberados al espacio extracelular en condiciones inflamatorias por células de origen hematopoyético como los eosinófilos y neutrófilos, alterando las concentraciones normales de ATP provocando la señalización por parte de los receptores purinérgicos (P2X y P2Y), los cuales pueden promover la contracción del músculo liso. Existen enzimas denominadas ectonucleotidasas (NTPDasas) las cuales se encargan de hidrolizar estos nucleótidos hasta sus respectivos nucleósidos para controlar este incremento en las concentraciones extracelulares de ATP y poder revertir la inflamación. Se ha demostrado que la rápida hidrólisis del ATP por parte de estas enzimas puede ayudar aliviar el broncoespasmo en modelos animales de asma alérgica, sin embargo, el papel de las NTPDasas en el asma no es del todo claro.

En este estudio se determinó la actividad total de la NTPDasa-1 en leucocitos totales y eosinófilos separados de pacientes con asma alérgica (n=11) y de sujetos sanos (n=12) provenientes de sangre periférica estimulados con 500  $\mu$ M de ATP. La determinación se llevó a cabo indirectamente mediante cinética enzimática tomando como unidad de medición la cantidad de fosfatos inorgánicos (Pi) liberados por las

células. Se compararon las poblaciones celulares estimuladas de ATP de ambos grupos de estudio, encontrando diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) entre eosinófilos de sujetos sanos y leucocitos totales del mismo grupo. También se encontró diferencia con eosinófilos de pacientes. La población de leucocitos totales de pacientes, mostraron diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.001$  con eosinófilos de ese mismo grupo de estudio y con leucocitos totales de sujetos sanos.

Estos resultados proponen dos hipótesis: primero, que el incremento del número de células totales podría contrarrestar la falla en la actividad de la NTPDasa y, por último, que la actividad de otras células inflamatorias relacionadas con esta patología podría estar involucrada en este mecanismo.

# ABSTRACT

Asthma is one of the diseases with the highest prevalence worldwide, affecting mainly children and the elderly, reason by which has become a worldwide health problem. The interest to reduce the incidence of this pathology has led her to become one of the most studied and described by various working groups, however, due to its multifactorial nature there is no definitive treatment for this, and only has limited to maintenance and treatment of the characteristic symptoms as hyperreactivity, bronchospasm and airway inflammation.

There is suggestive evidence that an important marker in asthma is ATP and its derived nucleotides, which act as proinflammatory mediators that can intensify the exacerbation episodes of the disease. These nucleotides are released into the extracellular space under inflammatory conditions by cells of hematopoietic origin such as eosinophils and neutrophils, altering normal concentrations of ATP triggering the signaling by purinergic receptors (P2X and P2Y), which can promote smooth muscle contraction. There are enzymes called ectonucleotidases (NTPDases) which are responsible for hydrolyzing these nucleotides to their respective nucleosides to control the increase in extracellular concentrations of ATP and to reverse the inflammation. It has been shown that the quick hydrolysis of ATP by these enzymes may help to alleviate bronchospasm in animal models of allergic asthma, however, the role of NTPDases in asthma is not entirely clear.

In this study, the total activity of NTPDase-1 was determined in total leukocytes and eosinophils separated from patients with allergic asthma (n = 11) and healthy subjects (n = 12) from peripheral blood stimulated with 500  $\mu$ M of ATP. The determination was carried out indirectly by enzymatic kinetics taking as a unit of measurement the amount of inorganic phosphates (Pi) released by the cells. The stimulated ATP cell populations of both study groups were compared, finding a significant difference ( $p < 0.001$ ) between eosinophils from healthy subjects and total leukocytes from the same group. A difference was also found with eosinophils

from patients. The total leukocyte population of patients showed a statistically significant difference of  $p < 0.001$  with eosinophils from the same study group and with total leukocytes from healthy subjects.

These results propose two hypotheses: first, that the increase in the number of total cells could counteract the failure in NTPDase activity and, finally, that the activity of other inflammatory cells related to this pathology could be involved in this mechanism.

## 1. INTRODUCCIÓN

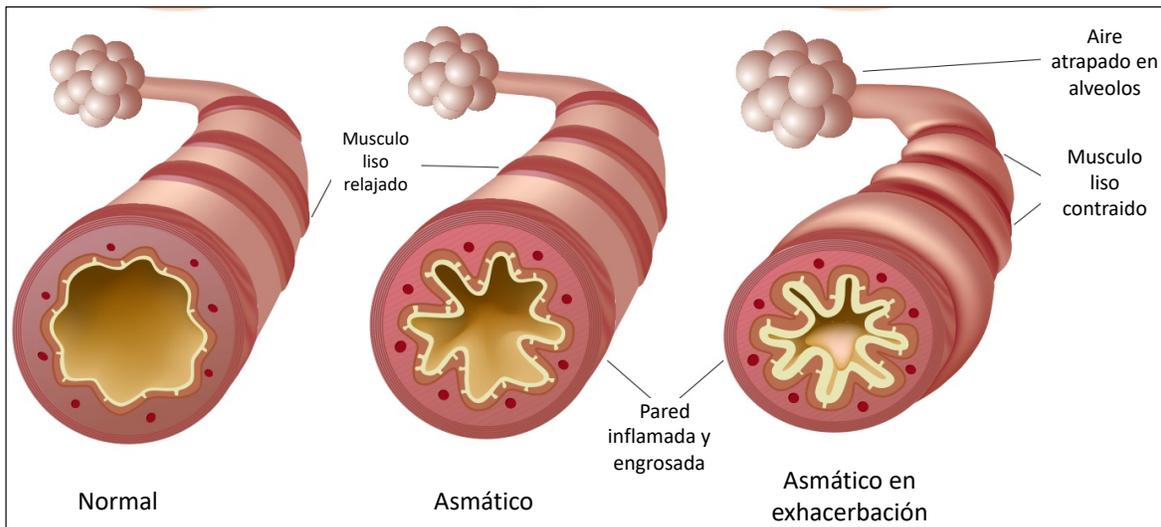
El asma es la enfermedad no transmisible con la mayor prevalencia a nivel mundial, se estima que unos 250 millones de personas la padecen siendo en su mayoría niños (“OMS | Asma,” 2013), sin embargo, un reporte del año 2014 (“The Global Asthma Report 2014,” 2014) coloca esta cifra en 334 millones de personas que padecen esta enfermedad. La Secretaria de Salud del Gobierno de México reporta que, esta enfermedad, es padecida por aproximadamente un 7% de la población total del país, por lo que la vuelve una de las 20 principales enfermedades a nivel nacional (“Programa Nacional de Población 2001-2006 | Consejo Nacional de Población CONAPO”) y por ende un problema de salud. El desarrollo de esta patología no tiene un origen definido ya que es una enfermedad multifactorial pudiéndose desarrollar a lo largo de la vida de un individuo; sin embargo, es más probable desencadenarla en estadios tempranos de la vida, ya que se es susceptible a una gran variedad de agentes ambientales, biológicos, e incluso a la misma predisposición genética del individuo. Esta razón coloca al asma como la enfermedad crónica de vías respiratorias mas frecuente en poblaciones menores de edad (Myers, 2000).

### 1.1. *Fisiopatología*

Según la *Global Initiative for Asthma* (GINA, 2017), el asma es una enfermedad heterogénea caracterizada por la inflamación crónica de la vía aérea, la cual tiene síntomas variables que la caracterizan como: disnea, sibilancias, opresión torácica, dificultad para exhalar el aire y tos persistente; los individuos que padecen esta enfermedad, pueden desarrollar episodios donde se exacerban los síntomas y pone en riesgo su vida. A estos episodios comúnmente se le denominan como exacerbaciones o crisis asmáticas, las cuales, además de generar los clásicos marcadores del asma (hiperreactividad, broncoespasmo e inflamación de la vía aérea) (**Figura 1**). La hiperreactividad se define como el incremento en la

sensibilidad de la vía aérea ante el estímulo inspiratorio, provocando el estrechamiento de la misma. Esta hipersensibilidad de la vía no se manifiesta en sujetos sanos y ocurre debido a la presencia de agentes como contaminación, alérgenos, aire frío o espasmógenos como metilcolina e histamina. El estrechamiento de la vía anteriormente mencionado es conocido comúnmente como broncoespasmo, el cual puede ir acompañado por hipersecreción de moco producido por las glándulas submucosas dificultando aun mas el flujo de aire causando la obstrucción de la vía. Finalmente, la inflamación de la vía causada por el influjo de células inflamatorias y mediadores proinflamatorios liberados durante la progresión de la enfermedad provocan el engrosamiento de la pared traqueobronquial causando la denominada broncoconstricción.

La falta de tratamiento o el mal seguimiento del mismo puede ocasionar que estos marcadores típicos del asma se agraven provocando incluso daños epiteliales y microvasculares que podrían desarrollar un proceso de remodelación en la vía aérea provocando daños irreversibles en la misma (Belvisi et al., 2018; Haselkorn et al., 2009; Prieto & Queipo, 2000)



**Figura 1.** Representación gráfica de la vía aérea en estadio normal y en el desarrollo de la enfermedad.

Los episodios exacerbados o crisis, se clasifican por severidad según la intensidad de los síntomas, así como la función pulmonar del individuo, resaltando el volumen expiratorio forzado al 1er segundo (FEV<sub>1</sub>), el porcentaje de saturación de oxihemoglobina (SaO<sub>2</sub>), la presión arterial de oxígeno (PaO<sub>2</sub>) y la presión arterial de dióxido de carbono (PaCO<sub>2</sub>) (Bermeo-Limon & Velasco-Díaz, 2013) (**Tabla 1**).

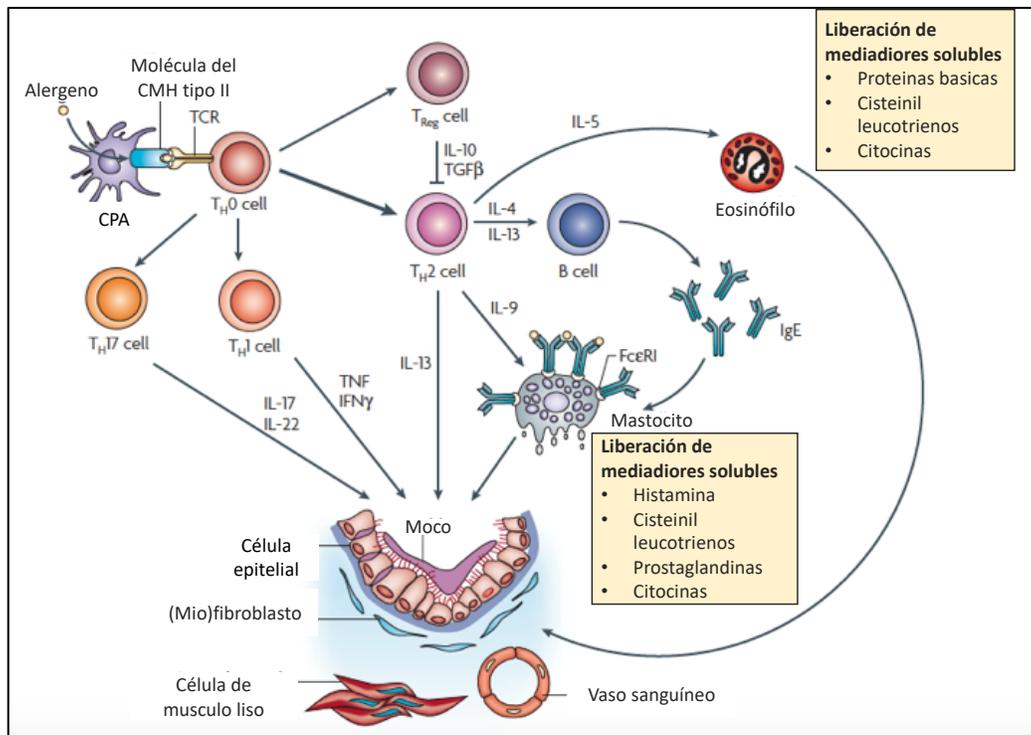
**Tabla 1.** Evaluación de las crisis asmáticas según su severidad

	<b>Crisis Leve</b>	<b>Crisis Moderada-Severa</b>	<b>Paro Respiratorio</b>
<b>Disnea</b>	Leve	Moderada-Intensa	Muy intensa
<b>Habla</b>	Párrafos	Frases-Palabras	Nula
<b>Frecuencia respiratoria</b>	Aumentada	> 20-30	
<b>Frecuencia cardiaca</b>	< 100	> 100-120	Bradycardia
<b>Uso musculatura accesoria</b>	Ausente	Presente	Movimiento toracoabdominal
<b>Sibilancias</b>	Presente	Presentes	Silencio auscultatorio
<b>Nivel de consciencia</b>	Normal	Normal	Disminuido
<b>Pulso paradójico</b>	Ausente	> 10-25 mmHg	Ausencia (fatiga muscular)
<b>FEV<sub>1</sub> o PEF (valores de referencia)</b>	> 70%	< 70%	
<b>SaO<sub>2</sub> (%)</b>	> 95%	90-95%	< 90%
<b>PaO<sub>2</sub> mmHg</b>	Normal	80-60	< 60
<b>PaCO<sub>2</sub> mmHg</b>	< 40	> 40	> 40

## **1.2. Inmunopatología**

El mecanismo inmunológico involucrado en la respuesta alérgica (**Figura 2**) comienza con el reconocimiento del antígeno por parte de las células presentadoras (CPA) las cuales presentan biomoléculas como péptidos y carbohidratos selectos en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH II) a los linfocitos T vírgenes, dirigiendo la polarización en favor al fenotipo de células cooperadoras (T<sub>H</sub>) tipo 2 donde el factor de transcripción GATA 3 media la secreción de citocinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, GM-CSF) específicas de este fenotipo

(Hammad & Lambrecht, 2006); a esto se le conoce tradicionalmente como balance  $T_H2$ -  $T_H1$  (**Figura 3**).

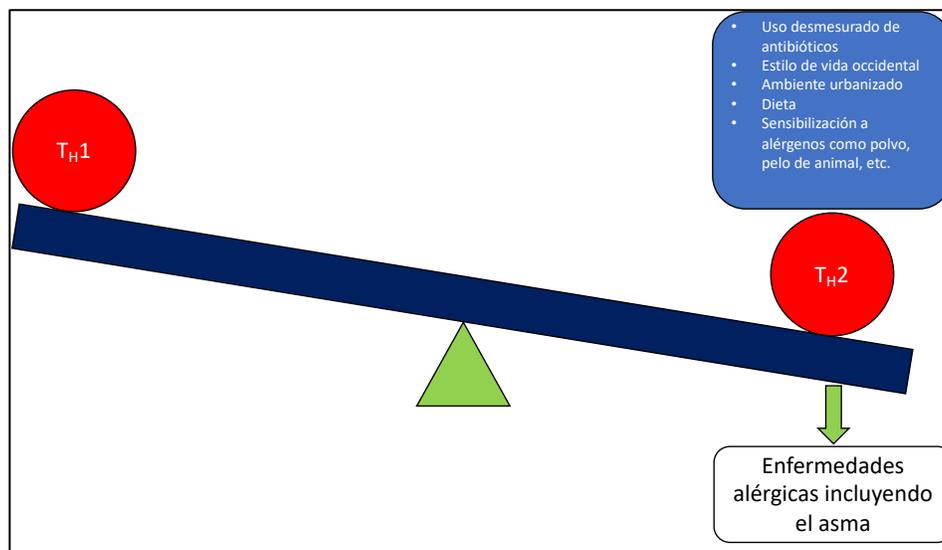


**Figura 2.** Mecanismo inmunológico envuelto en la respuesta alérgica. (Imagen tomada de (Holgate & Polosa, 2008)

Algunas de estas citocinas intervienen directamente en la síntesis de inmunoglobulina E (IgE) por parte de los linfocitos B y es captado por los receptores de alta afinidad (FcεRI) encontrados en la membrana de las células cebadas. Subsecuentes exposiciones al alérgeno, provocan el reclutamiento de células inflamatorias al sitio de acción y a la liberación de mediadores por parte de las mismas células responsables de causar la respuesta aguda asmática (exacerbación) y así, perpetuar la respuesta inflamatoria hasta su fase tardía (Cockcroft, Hargreave, O'Byrne, & Boulet, 2007)

La fase temprana de la exacerbación asmática se lleva a cabo minutos después de que el alérgeno es captado por las CPA; los mastocitos sensibilizados a IgE, degranulan su contenido liberando mediadores como histamina, prostaglandinas,

tromboxanos, ATP (adenosín trifosfato) y leucotrienos. Estos últimos, se encargan de incrementar la expresión en el endotelio de P-selectina y E-selectina, glucoproteínas de membrana encargadas de iniciar el rodamiento leucocitario, así como incrementar la expresión de moléculas de adhesión como lo es ICAM 1 (intracelular) y VCAM 1 (vascular). Además, se liberan citocinas que promueven la permeabilidad vascular, la contracción del musculo liso y la hipersecreción de moco (Kelly, Hwang, & Kubes, 2007). Los mastocitos también liberarán citocinas quimiotácticas como el ligando de quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL24 y CCL26, las cuales pueden promover el reclutamiento de células inflamatorias que contribuyen en la fase tardía de la respuesta alérgica (C. Palmqvist, Wardlaw, & Bradding, 2007), la cual está caracterizada principalmente por la afluencia de eosinófilos y células  $T_H2$ .



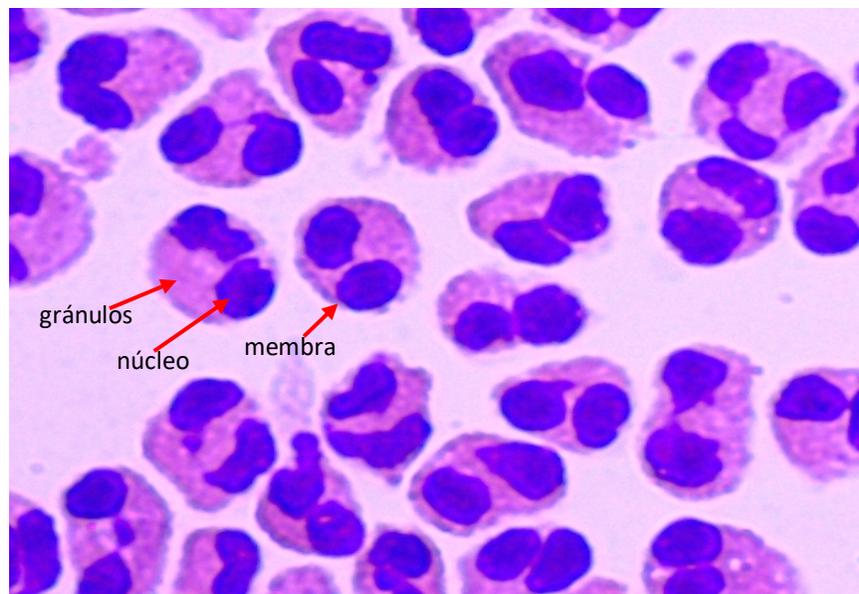
**Figura 3.** Representación del balance hipotético entre población  $T_H1$  y  $T_H2$ . (Imagen obtenida y editada de Morgan et al., 2004)

Como fue puntualizado anteriormente, existen diversos tipos celulares presentes de manera circulatoria dividiéndose en dos grandes grupos, células mononucleares, donde se encuentran monocitos y linfocitos, caracterizados principalmente por poseer un núcleo redondo y definido. El otro grupo corresponde a las células polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), que como su nombre lo

dice, su núcleo puede poseer diversas formas, siendo principalmente alargado y con presencia de gránulos en su citoplasma. Estas son enzimas especializadas que, en presencia de un proceso infeccioso o alérgico, se liberan al espacio extracelular, actuando como agentes pro inflamatorios (Peters, Nguyen, & Dunican, 2016).

### 1.3. Eosinófilos

Específicamente, los eosinófilos son granulocitos de origen hematopoyético (Sandoval-Benetti, Sánchez, Baleirón, Bogado, & Romero-Valdez, 2010) los cuales liberan un gran número de mediadores proinflamatorios, incluyendo cisteinil leucotrienos y proteínas básicas como la eosinófilo peroxidasa, proteína catiónica, proteína básica mayor y neurotoxina derivada de eosinófilos (Pease & Williams, 2006), así como citocinas proinflamatorias (IL-3, IL-5 e IL-13). Poseen una característica que aún no ha sido reconocida del todo, la cual propone que estas células responden a señales de peligro a ciertos agentes, como puede ser el polvo o algunos alérgenos que potencialmente podrían desencadenar un episodio asmático (Kobayashi, Kousaki, & Kita, 2010)



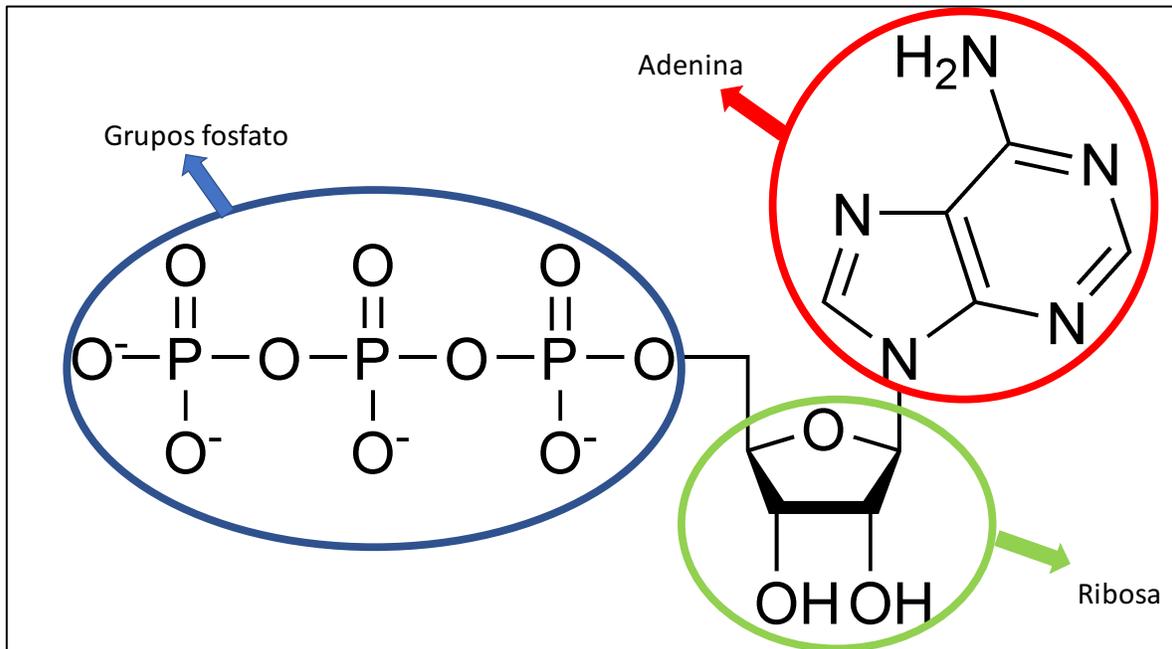
**Figura 4.** Estructura de los eosinófilos.

Por otro lado, se ha demostrado que existen otros fenotipos de linfocitos T involucrados en el mecanismo de la respuesta inmunológica. Uno de ellos son los linfocitos T reguladores/supresores ( $T_{\text{regs}}$ ), los cuales expresan  $CD25^+CD4^+FOXP3$  (factor de transcripción responsable de la supresión de la respuesta  $T_H2$ ) y el receptor de IL-2, el cual, actúa como factor de crecimiento para linfocitos T, así como en la regulación inmunitaria promoviendo la liberación de interferón e induciendo la liberación de IL-1y factor de necrosis tumoral (TNF) $\alpha$  y  $\beta$ . Estas células están implicadas en la supresión de la respuesta inmunitaria frente antígenos extraños o propios, mediante la influencia de estas sobre la actividad de otras células del sistema inmunitario, a través de la producción de citocinas inhibitorias como IL-10 y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el cual induce las  $T_{\text{regs}}$  y participa directamente en la supresión de las células T efectoras (Maazi et al., 2012). Otro fenotipo celular que se ha identificado es el  $T_H17$ , reconocido principalmente en pacientes con asma refractaria, o asma resistente al tratamiento, cuyos episodios o exacerbaciones son de la mayor severidad y frecuencia, y no pueden ser controlados adecuadamente mediante los esquemas de tratamiento recomendados en las diversas guías enfocadas en esta patología. Esta población de células  $CD4^+$  están asociadas con una inflamación neutrofílica a través de la secreción de IL-17 e IL-17F (Choy et al., 2015). El factor transcriptor ROR $\gamma$ t identifica a las células  $T_H17$  y es activado selectivamente por IL-1 $\beta$  e IL-6, siendo IL-23 responsable de la proliferación de este tipo de linfocitos. La citocina IL-17 está sobre expresada la vía aérea de un sujeto asmático asociada también a una afluencia de neutrófilos (Cosmi, Liotta, Maggi, Romagnani, & Annunziato, 2011).

#### **1.4. ATP y receptores purinérgicos**

Dentro de los diferentes mediadores proinflamatorios anteriormente mencionados, se encuentra la molécula de ATP (**Figura 5**). Es conocida generalmente por participar en diversos procesos energéticos y metabólicos. Fue descrita por primera vez como neurotransmisor en 1981 por Burnstock y recientemente, como mediador

de la comunicación celular (Idzko et al., 2007). Esta molécula es generada en la fosforilación oxidativa por acción de la ATP sintasa y también considerada como ubicua al estar presente en todo tipo de células (Burnstock, 1991).



**Figura 5.** Estructura molecular del ATP y sus diferentes componentes

Las concentraciones normales de ATP dentro de las células oscila entre 1-10 mM; mientras que en el espacio extracelular se encuentran en rangos nanomolares (Trautmann, 2009). En trabajos recientes (Weigand, Ford, & Bradley, 2012) demostraron que la liberación de ATP como consecuencia de la contracción del músculo liso bronquial es responsable de la estimulación de fibras-C a partir de la interacción con los receptores purinérgicos P2X3. Por otro lado, se ha descrito que el ATP promueve la producción de tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ), el cual se encargara de potenciar el broncoespasmo en un modelo alérgico de cobayo (Chávez et al., 2013).

Los receptores purinérgicos son proteínas de la superficie celular que se unen a las purinas y generan cambios intracelulares que influyen sobre el comportamiento celular. Existen dos familias de estos receptores, las cuales han sido ampliamente descritas; la primera corresponde a los receptores P1R, los cuales, son

metabotrópicos unidos a una proteína  $G_q$  cuyo ligando específico es la adenosina extracelular (Alfieri et al., 2012).

Por otra parte, la segunda corresponde a los receptores P2R, los cuales se dividen en dos subfamilias; los P2Y y los P2X. Los receptores P2Y (1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14), son receptores metabotrópicos, unidos a una proteínas G y cuyos ligandos son nucleótidos extracelulares como ATP, ADP, UTP, UDP, ITP, entre otros, y movilizan  $Ca^{2+}$  intracelular del retículo sarcoplásmico vía trifosfato de inositol, el cual, estimulará la contracción del músculo liso (Khakh & North, 2006). Mientras que los receptores P2X (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7), son receptores ionotrópicos no selectivos dependientes totalmente de ATP, que debido a su conformación tetramérica, forman un canal abriendo o cerrando los enlaces que permiten el flujo de iones a través de la membrana dependiendo del estímulo (North, 2002). Se ha demostrado que algunos de estos receptores están asociados al proceso inflamatorio en el asma; no solo en presencia de una exacerbación, sino en todos los tejidos del sistema respiratorio (Lister et al., 2007), particularmente el receptor P2X<sub>7</sub>, el cual está expresado principalmente en células con origen hematopoyético.

### **1.5. Ectonucleotidasas**

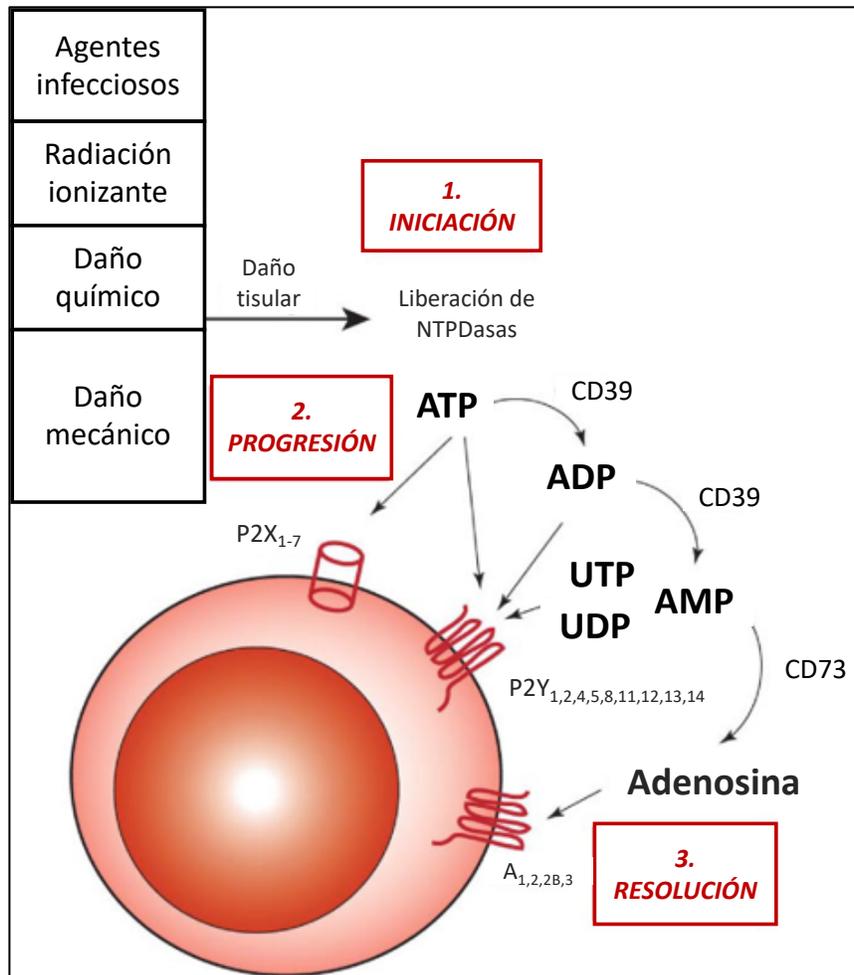
Existen una superfamilia de enzimas asociadas al ATP denominadas ectonucleotidasas, las cuales tienen como función principal hidrolizar nucleótidos extracelulares hasta sus respectivos nucleósidos (Robson, Sévigny, & Zimmermann, 2006). Estas enzimas se encuentran ancladas en la superficie celular y sus sitios catalíticos están localizados en dirección al espacio extracelular; otras hacia el interior de esta, y otras, como la 5'-nucleotidasa se encuentran de forma soluble. Las ectonucleotidasas se dividen en cuatro familias: la ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa (NTPDasa) la cual tiene 8 subtipos (**Tabla 2**), la fosfatasa alcalina, la nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (NPP) que engloba 5 subtipos, y la 5'-nucleotidasa (Grinthal & Guidotti, 2006).

**Tabla 2.** Nomenclatura y localización en el cromosoma de la familia NTPDasa  
(Tomada y traducida de Robson et al., 2006)

Nombre de la proteína	Nombres comunes	Nombre del gen	Localización en el cromosoma
NTPDasa 1	CD39, ATPDasa, ecto-apirasa	<i>ENTPD1</i>	10q24, 19C3
NTPDasa 2	CD39L1, ecto-ATPasa	<i>ENTPD2</i>	9q34, 2A3
NTPDasa 3	CD39L3, HB6	<i>ENTPD3</i>	3p21.3, 9F4
NTPDasa 4	UDPasa, LALP70	<i>ENTPD4</i>	8p21, 14D1
NTPDasa 5	CD39L4, ER-UDPasa, PCPH	<i>ENTPD5</i>	14q24, 12E (12D1)
NTPDasa 6	CD39L2	<i>ENTPD6</i>	20p11.2, 2G3
NTPDasa 7	LALP1	<i>ENTPD7</i>	10q24, 19D1 (19C3)
NTPDasa 8	Hígado calanicular ecto-ATPasa, hATPDasa	<i>ENTPD8</i>	9q34, 2A3

Específicamente, la NTPDasa-1 (CD39<sup>+</sup>) genera gran interés biológico y farmacológico debido a que junto con la 5-nucleotidasa (CD73<sup>+</sup>) y los receptores purinérgicos P2Y y P2X forman parte de una cascada de señales que generan información frente a diferentes estímulos, los cuales dictaminaran el proceder de las células (Wang et al., 2014). Esta cascada es denominada comúnmente como señalización purinérgica y está involucrada directamente en el proceso inflamatorio frente a diversos estímulos.

El progreso de esta señalización está dividido en tres fases: la fase de iniciación, la progresión y la resolución (**Figura 6**).



**Figura 6.** Desarrollo de la señalización purinérgica en un proceso inflamatorio. (Imagen tomada de Rossi, Salvestrini, Ferrari, Di Virgilio, & Lemoli, 2017)

En la fase de iniciación, se libera ATP de manera extracelular debido a la respuesta de células del sistema inmune posterior a señales causadas por daño o estrés celular, la inducción de algún agente patógeno, o por la captación de algún alérgeno como en el asma. El ATP puede actuar como señal de daño y dar alerta al sistema inmunológico, el cual promoverá el reclutamiento de células inflamatorias. El receptor P2X<sub>7</sub> por si mismo, participa en la liberación de ATP potenciando aún mas la señalización (Suadicaní, Brosnan, & Scemes, 2006). Como ya se había mencionado anteriormente, todas las células incluidas con origen hematopoyético, constitutivamente liberan ATP, esto con el objetivo de mantener en equilibrio la concentración de nucleótidos en rangos nanomolares (rangos establecidos como normales), sin embargo, la liberación de ATP en respuesta a diferentes estímulos

de daño, provoca que haya un desbalance entre nucleotidos, causando que se pueda desencadenar el proceso inflamatorio (Fredholm, 2007).

En la fase de progresión, el ATP liberado al espacio extracelular, puede estimular a los receptores P2 encontrados en la membrana celular, induciendo de esta manera, la atracción quimiotáctica de granulocitos y macrófagos al sitio de inflamación, así como la activación de las CPA. Esta acción promueve el inicio, de la respuesta inmune, provocando la amplificación del proceso inflamatorio (Wiley, Sluyter, Gu, Stokes, & Fuller, 2011).

Finalmente en la fase de resolución, se activa una respuesta anti-inflamatoria para proteger a los tejidos de un daño aún mas grave, ya que está mediada por la NTPDasa 1, la cual se encarga de hidrolizar el ATP hasta AMP, y posteriormente la 5'-nucleotidasa hidroliza al AMP para romper el enlace alfa del ultimo grupo fosfato y liberar así a la adenosina, la cual tiene una actividad anti-inflamatoria e inmunosupresora, bloqueando la expresion del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), inhibiendo la liberacion de citocinas proinflamatorias, así como la expresión de moléculas de adhesión (Zernecke et al., 2006)

## **1.6. Esquema de tratamiento**

Debido a su origen multifactorial, el asma no tiene una cura definitiva como tal, y todo el esquema de tratamiento de la misma esta basado en medicamentos enfocados en el control de los síntomas para evitar su progresión. El uso de estos fármacos se ve determinado por la gravedad de los sintomas donde las opciones de primera linea son las siguientes

### **1.6.1. Agonistas $\beta$ 2 adrenérgicos**

Este tipo de fármacos actúan uniéndose a los receptores adrenérgicos  $\beta$ 2 estimulando a la enzima adenilato ciclasa mediante la transducción de señales de

la proteína  $G_s$ , con la finalidad de incrementar la producción y liberación de AMP cíclico (cAMP), activando así, la proteína cinasa A. Esto promueve la relajación del músculo liso a través de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina cinasa y por la apertura de los canales de potasio dependiente de calcio ( $KCa^{2+}$ ), aliviando el broncoespasmo en el asma (Holgate & Polosa, 2008). Dentro de este grupo de farmacos se encuentran los beta-agonistas de corta acción (SABA, por sus siglas en inglés), como el salbutamol, levalbuterol, metaproterenol y turbulina; los cuales son indicados por ser los broncodilatadores mas efectivos para el alivio rapido de los sintomas del asma. Los beta-agonistas de larga duración (LABA, por sus siglas en ingles), como el salmeterol y el formeterol, inducen la broncodilatación por al menos 12 horas a partir de su administración (Palmqvist et al., 1997). Son indicados como terapia suplementaria para el asma que no es controlada por corticoesteoides inhalados.

### **1.6.2. Corticoesteroides**

Los corticoesteroides se difunden a través de la membrana celular donde se unen a los receptores citoplasmáticos para glucocorticoides. Esto da como resultado la activación de estos receptores y su posterior translocación al núcleo, donde la actividad transcripcional de los genes-objetivo es modulada por varios mecanismos, incluyendo la transactivación y transrepresión de estos genes (Holgate & Polosa, 2008). En la inflamación mediada por células  $T_H2$ , los corticoesteroides actúan inhibiendo la expresión de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión cuyos genes estan regulados por factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y por la proteína activadora 1 (AP1) (Barnes & Adcock, 1998). El tratamiento con corticoesteroides es altamente efectivo suprimiendo la inflamación de la vía aérea; sin embargo, existen casos específicos como las exacerbaciones producidas por un cuadro viral y en sujetos asmáticos fumadores, donde no tendran ningún efecto. El propionato de fluticasona y budesonida, son dos de las corticoesteroides inhalados mas recetados para esta patología, sin embargo en casos puntuales es normal el uso de prednisona y dexametasona (Paniagua et al., 2017).

### **1.6.3. Terapias complementarias**

De manera general, estos son los dos grandes grupos de fármacos utilizados para el control del asma, sin embargo existen otros tipos de medicamentos, como los modificadores de leucotrienos, los cuales son antagonistas de los receptores de cisteinil leucotrienos-1 (CysLTR1). El fármaco más utilizado de este tipo es montelukast, el cual está indicado como terapia suplementaria a los corticoesteroides inhalados. Además existen medicamentos cuyo blanco terapéutico son las citocinas específicas que se encargan de la inflamación alérgica característica de la vía  $T_H2$ ; estos son denominados anticuerpos monoclonales (omalizumab, mepolizumab, etc) y actúan bloqueando e inhibiendo la acción y producción de interleucinas como IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IL-13.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

En un trabajo previo, usando un modelo de reto antigénico en cobayos, se encontró que la ovoalbúmina producía un incremento en la resistencia pulmonar y que al administrar un inhibidor de las ectonucleotidasas (ARL-67156) a los animales, previo al reto antigénico, causaba un severo broncoespasmo y la muerte del 44% de los animales (Chávez *et al*, 2013). Estos resultados permitieron especular que el modelo de asma alérgico puede modular la expresión o cantidad de enzimas disponibles para degradar el ATP extracelular.

## **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Al respecto, poco se sabe del papel que desempeñan estas enzimas y en particular la NTPDasa-1/CD39<sup>+</sup> que se localiza en eosinófilos de pacientes con asma alérgica. Teniendo en cuenta que esta enfermedad es mediada principalmente por eosinófilos, es importante conocer si existe alguna deficiencia en el funcionamiento de esta enzima que pudiera comprometer la hidrólisis del ATP producido y liberado en una exacerbación, potenciando así el episodio de crisis.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la actividad de la NTPD-1 de eosinófilos en muestras de pacientes con asma alérgica.

##### **4.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Cuantificar la cantidad de fosfatos inorgánicos liberados por la hidrólisis de ATP en eosinófilos provenientes de pacientes asmáticos estables.
- Comparar la proporción de eosinófilos con respecto a los demás tipos celulares en sangre periférica de pacientes con asma alérgica y sujetos clínicamente sanos.
- Correlacionar la localización geográfica de los pacientes con la actividad enzimática

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Criterios

Se reclutaron 12 sujetos clínicamente sanos y 12 pacientes con asma alérgica diagnosticada, los cuales debían cursar con una exacerbación al momento del estudio cumpliendo con los siguientes criterios:

#### *Inclusión*

- Pacientes mayores de 18 años de sexo indistinto con asma alérgica diagnosticada.
- Que aceptaran participar en el estudio dando su consentimiento informado.

#### *Exclusión*

- Pacientes que presenten diabetes, obesidad, o ambas patologías.
- Pacientes que presenten otra enfermedad pulmonar.
- Pacientes que presenten alguna enfermedad infecciosa.
- Fumadores de más de 10 cigarros al día.

#### *Eliminación*

- Toda muestra de paciente que no sea posible procesar.

Los pacientes fueron valorados y reclutados para su posible incursión en el estudio en el pabellón 5 del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” mientras que los sujetos control se reclutaron y fueron valorados mediante su expediente a lo largo del estudio en diferentes instancias del Instituto. Posterior a la invitación al estudio a ambos grupos se les solicitó el consentimiento informado para el uso de su muestra.

Se procedió a tomar una muestra de entre 10 y 14 ml de sangre periférica mediante punción venosa en tubos con EDTA K3E (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Alemania), y fueron transportadas en un contenedor adaptado para muestras al laboratorio de Hiperreactividad Bronquial donde se realizó el procesamiento.

## **5.2. *Procesamiento de la muestra***

En tubos de 12 ml con tapón hermético se colocó una cantidad de Polymorphprep (Axis-Shield, Oslo, Noruega) acorde a las instrucciones del fabricante para tener una relación de 1:1 entre el reactivo y la muestra sanguínea, posteriormente se centrifugó bajo las siguientes condiciones: 18 min, 25°C, 3600 rpm. Al término del ciclo de centrifugación, la muestra se separó en dos anillos, el anillo superior correspondía a las células mononucleares y el anillo inferior estaba conformado por células polimorfonucleares. Ambos anillos se recuperaron en 2 tubos diferentes de 50 ml (Falcon®, New York, USA) donde se agregó aproximadamente 20 ml de medio de cultivo RPMI sin aminoácidos (Lonza®, Basilea, Suiza) para evitar el estrés celular; se centrifugaron nuevamente, a 10 min, 25°C, 1800 rpm. Finalizado este paso, se descartó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 20 ml de una solución de lisis (600 mg NaHCO<sub>3</sub>, 4.15 g NH<sub>4</sub>Cl y 10 mg de EDTA) para eliminar la contaminación con eritrocitos que pudieran quedar aún en el botón celular y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones que el procedimiento anterior. Finalmente, ambos botones celulares, se resuspendieron en 1 ml de una solución compuesta por 1X PBS, 2 mM EDTA y 0.2% BSA. Se realizó un conteo total para determinar la cantidad de células obtenidas, así como la integridad celular con azul de tripano al 0.4%.

## **5.3. *Marcado magnético y separación negativa***

Posterior a la determinación del número de células, se realizó el marcado magnético con un kit para separación de eosinófilos del paquete celular total (Eosinophil Isolation Kit, Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Primeramente, se centrifugaron las muestras a 10 min, 25°C, 1800 rpm; se decantó el sobrenadante para resuspender el botón celular con 40 µL del buffer de trabajo (1X PBS, 2 mM EDTA y 0.2% BSA) por cada 10<sup>6</sup> células obtenidas. Se agregaron 10 µL del Biotin-Antibody Cocktail (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) por cada 10<sup>6</sup> células y se incubaron en refrigeración (2-8 °C)

durante 10 min; posteriormente se agregaron 30  $\mu\text{L}$  del buffer de trabajo por cada  $10^6$  células y posteriormente 20  $\mu\text{L}$  del Anti-Biotin MicroBeads por cada  $10^6$ , se mezcló y se incubó nuevamente en refrigeración durante 15 min. Por último, se lavaron las células con 1 ml del buffer de trabajo y se centrifugaron con las mismas condiciones antes mencionadas. Para llevar a cabo la separación negativa de los eosinófilos, se utilizó el equipo OctoMacs Separator™ y MS Columns (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania). La muestra ya centrifugada se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  del buffer de trabajo. Se ubicó el magneto en la base metálica y en una gradilla de acrílico se colocó un tubo para la colección de la muestra; la columna se puso sobre el magneto y se preparó agregando 500  $\mu\text{L}$  del buffer de trabajo dejando que pasara por la columna lubricando las perlas magnéticas. Después se agregó la suspensión de células en la columna colectando el líquido y haciendo pasar 500  $\mu\text{L}$  del buffer tres veces a la columna. Ese volumen separado negativamente correspondió al total de eosinófilos. Posteriormente se eluyó con 1 ml de buffer las células marcadas en la columna correspondiente a la proporción de neutrófilos. Ambas muestras se colocaron en hielo hasta su posterior uso.

#### **5.4. Cinética enzimática**

Para determinar la actividad enzimática de la NTPDasa-1, se utilizó tanto el paquete leucocitario total como los eosinófilos aislados del mismo sujeto de estudio. Posterior a la separación negativa, todas las células fueron al final centrifugadas durante 10 min, a 1800 rpm y  $25^\circ\text{C}$ . El botón celular se resuspendió en 1 ml de una solución compuesta por 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glucosa, 50 mM TRIS-HCl (pH 8.0). Se tomaron dos alícuotas de  $10^6$  células por cada muestra y se colocaron en tubos libres de fosfatos ajustando el volumen a 1 ml con la misma solución. Se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  con y sin ATP (500  $\mu\text{M}$ ) (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, E.U.A) y cada minuto durante 10 min se tomó una alícuota (Munkonda et al., 2007). Para detener su actividad, cada muestra fue colocada en tubos enfriados en hielo y mantenidas hasta completar el tiempo de cada cinética. Posteriormente, se mezclaron 32  $\mu\text{L}$  de cada muestra y 128  $\mu\text{L}$  de una solución

compuesta por una relación de 2:2:1 v/v, de verde de malaquita (Sigma-Aldrich, San Luis Misuri, E.U.A), agua ultrapura y  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, San Luis Misuri, E.U.A), disuelto en HCl 6N, en una microplaca de 96 pozos, placa que también se mantuvo enfriada en hielo. Esta placa se colocó en un agitador oscilatorio a 65 rpm durante 10 min. Posteriormente, el cambio de color en la placa fue detectado mediante un lector de microplacas (Synergy™ HT. Biotek, Winooski, Vermont, E.U.A) con una longitud de onda de 630 nm. Todos los datos se manejaron con el programa Gen5 del mismo fabricante.

Se realizó una curva estándar (1, 3.2, 5, 10, 32, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para interpolar los datos obtenidos de cada muestra.

### **5.5. *Conteo celular diferencial***

Para realizar el conteo diferencial de las poblaciones celulares, se realizaron frotis celulares en laminillas convencionales, mediante una citocentrifuga (Cytopro®, Wescor Inc, Logan, Utah, E.U.A) a 1500 rpm durante 5 min. Finalmente, las laminillas obtenidas se deshidrataron con metanol grado reactivo y se tiñeron mediante la técnica Romanowsky.

### **5.6. *Análisis estadístico***

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS V22.0 (IBM, Armonk, Nueva York) en conjunto con el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc, San Diego, California, E.U.A). Se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para determinar la distribución de los datos y dependiendo del resultado se aplicarían las pruebas de análisis correspondientes.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Características generales

Conforme al número de sujetos reclutados para este estudio, se dividieron en dos grupos de contraste, controles y pacientes con asma, y se obtuvieron sus características cuantitativas generales (edad, peso y talla) (**tabla 3**).

**Tabla 3.** Características generales de ambos grupos de estudio

	Control n=12	Asma n=11	Valor <i>p</i>
Edad	32±11.37	41±13.85	NS
Peso	67±12.29	70.7±11.84	NS
Talla	167.25±8.65	167±6.66	NS

*NS. No significativa*

Los datos se analizaron inicialmente para evaluar la normalidad (**tabla 3**) de estos mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov, obteniendo una distribución normal en los valores ( $p>0.05$ ) Posteriormente se realizó una prueba “*t*” de Student para muestras independientes manejando una  $p<0.05$  como significancia estadística. En los valores mostrados se observa que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las características generales de ambos grupos de estudio. Se buscó que por cada sujeto con asma hubiera un control con características similares.

### 6.2. Análisis de la población celular de sangre periférica

Se determinó la proporción de cada población celular proveniente de sangre periférica. En ambos grupos de estudio se realizó un conteo el cual se muestra en la **tabla 4**.

**Tabla 4.** Porcentaje de células por población de cada grupo de estudio

	Sanos n=12	Asma n=11
Monocitos (%)	77	43.1
Linfocitos (%)	3.7	7.4
Neutrófilos (%)	11	22.3
Eosinófilos (%)	8.3	27.2

Se determinó que la población celular predominante en ambos grupos de estudio es la de monocitos, sin embargo, las muestras de pacientes con asma son menores que las muestras provenientes de sujetos sanos, 43.1% por 77% respectivamente. En cuanto al número de linfocitos, incremento en pacientes con asma. Con respecto a neutrófilos y eosinófilos, el número de estas células incremento en pacientes con asma con respecto a los sujetos sanos.

### **6.3. Determinación del número de eosinófilos**

Posterior al proceso de purificación celular se realizó el conteo total de leucocitos y se ajustó a una cantidad de 25 millones de células/ml por cuestiones de estandarización para realizar la separación negativa. Se determinó el número de eosinófilos obtenidos mediante la separación (**Tabla 5**), así como el número restante de células marcadas positivamente con el anticuerpo.

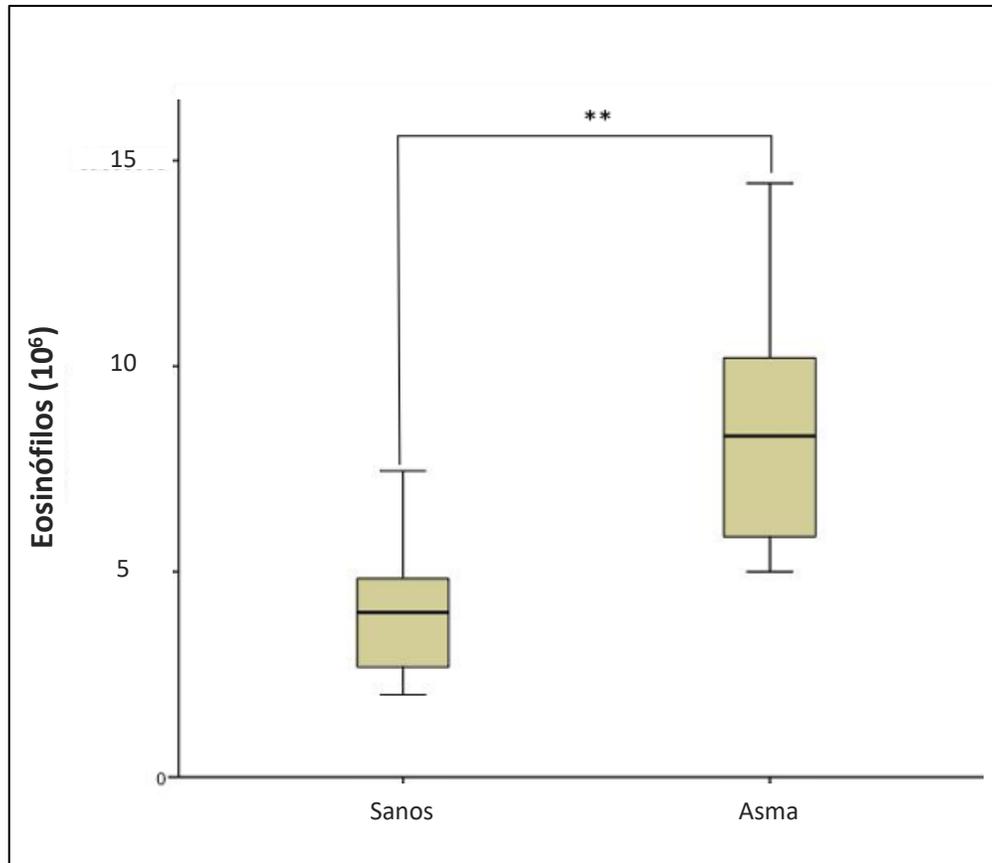
**Tabla 5.** Número de eosinófilos en ambos grupos de estudio

	Sanos $4 \times 10^6$	Asma $8.57 \times 10^6$	Valor <i>p</i>
No. de eosinófilos	(2.35 - $5.1 \times 10^6$ )	(5.65- $10.3 \times 10^6$ )	<0.001

*p*<0.05. Significancia estadística.

Se obtuvo la mediana y los rangos intercuartílicos de ambos grupos de estudio, y mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney se determinó la significancia

estadística obteniendo un valor de  $p < 0.001$ , lo cual indicó que el incremento de eosinófilos en pacientes con asma con respecto a sujetos sanos representa una diferencia mayor a la planteada inicialmente.

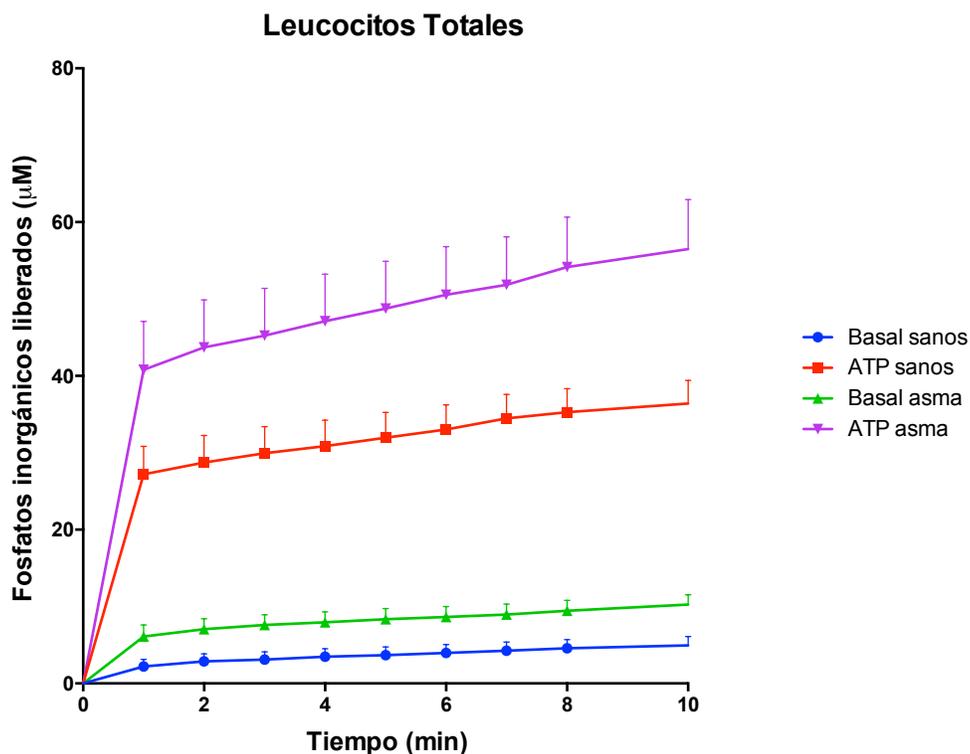


**Figura 7.** Dispersión del número de eosinófilos totales/ml de ambos grupos.

En la **figura 7** se muestra la dispersión de los valores obtenidos en la obtención del número de eosinófilos en los grupos de estudio, demostrando que hay diferencia estadísticamente significativa entre grupos; por lo que pudimos corroborar que la estandarización y la metodología aplicada para la obtención de este tipo de células fue exitosa. Además de que, en efecto, los pacientes estaban cursando por un proceso inflamatorio al momento de la toma de muestra.

#### 6.4. Actividad de la NTPDasa-1

Se realizó la cinética enzimática para determinar la actividad de la NTPDasa1, tanto en leucocitos totales como en los eosinófilos previamente separados de ambos grupos. En la **figura 8**, se muestra el comportamiento de leucocitos totales en presencia del estímulo de ATP y en estado basal, tanto de sujetos sanos como en pacientes con asma.



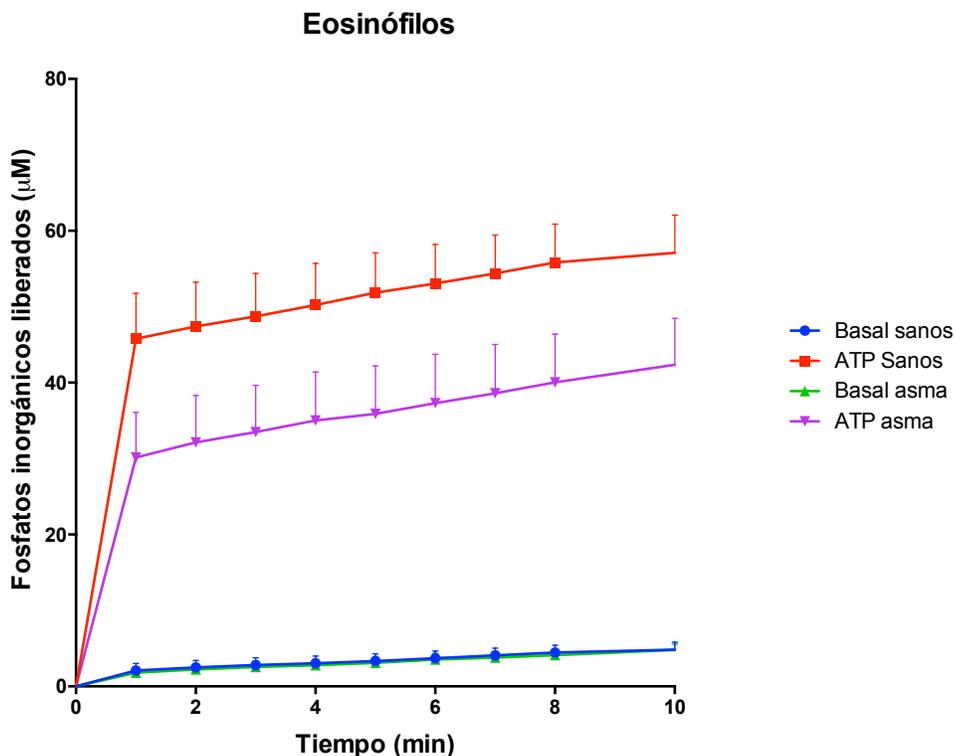
**Figura 8.** Actividad enzimática en leucocitos totales de sangre periférica de sujetos sanos y asmáticos. Los datos representan promedio  $\pm$  error estándar.

La actividad enzimática en leucocitos totales de pacientes con asma muestra un incremento en la concentración de fosfatos ( $P_i$ ) liberados ( $\mu M$ ) con respecto a los sujetos sanos desde el estado basal, ya que al primer minuto se obtuvo  $2.221 \mu M$  en sanos, mientras que en pacientes el valor incremento a  $6.089 \mu M$ . A la mitad de tiempo de la cinética el valor registrado para sanos y para asmáticos fue de  $3.682$

$\mu\text{M}$  y  $8.348 \mu\text{M}$ . Al término de la cinética de sujetos sanos el valor fue de  $4.954 \mu\text{M}$  por  $10.257 \mu\text{M}$  en pacientes con asma.

En cuanto a los leucocitos estimulados con  $500 \mu\text{M}$  de ATP se observa que el comportamiento es similar a lo registrado en el estado basal de ambos grupos de estudio, encontrando un incremento en asmáticos con respecto a sujetos sanos. Al inicio de la cinética, el valor registrado fue de  $27.196 \mu\text{M}$  en sujetos sanos y  $40.797 \mu\text{M}$  en pacientes con asma, mientras que al minuto 5 los valores fueron de  $31.961 \mu\text{M}$  y  $48.742 \mu\text{M}$  respectivamente. Finalmente, al minuto 10 se reportó un valor de  $36.415 \mu\text{M}$  en sujetos sanos y  $56.485 \mu\text{M}$  en pacientes con asma.

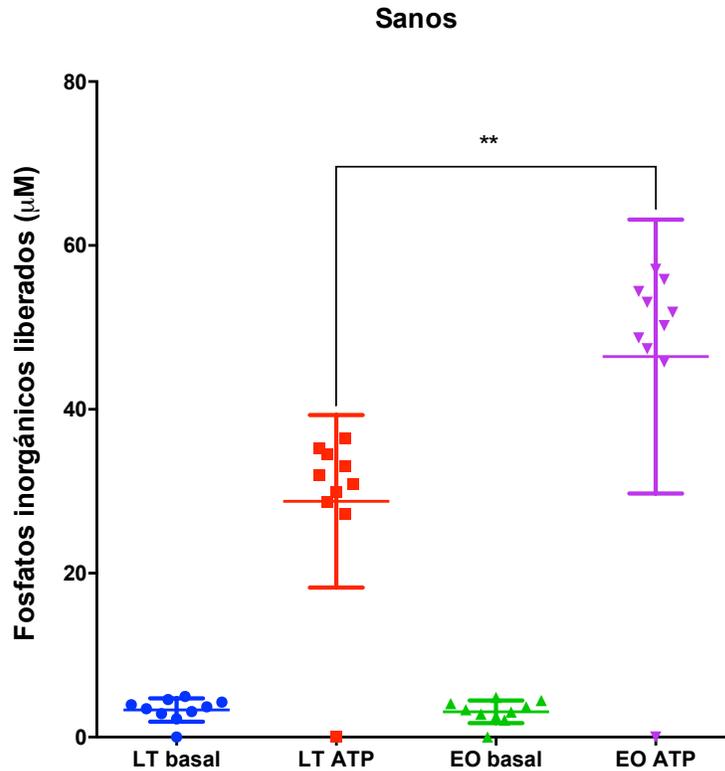
De la misma manera que con los leucocitos totales, se realizaron las cinéticas en los eosinófilos separados y los datos encontrados se muestran en la **figura 9** a continuación presentada.



**Figura 9.** Actividad enzimática en eosinófilos de sangre periférica de sujetos sanos y asmáticos. Los datos representan promedio  $\pm$  error estándar.

Las concentraciones de  $P_i$  registradas en eosinófilos muestran el mismo comportamiento asintótico encontrado en leucocitos totales, sin embargo, a diferencia de leucocitos, los eosinófilos de pacientes con asma estimulados con ATP mostraron una disminución con respecto a los sujetos sanos, ya que al primer minuto de cinética el valor registrado fue de 45.788  $\mu\text{M}$  células por 30.156  $\mu\text{M}$  células de pacientes con asma. Al minuto 5 el valor para sanos y para asmáticos fue de 51.843  $\mu\text{M}$  y 35.878  $\mu\text{M}$  respectivamente. Al cabo de los 10 minutos de actividad enzimática se registraron los valores de 57.096  $\mu\text{M}$  para sujetos sanos, y para pacientes con asma el valor obtenido fue de 42.348  $\mu\text{M}$ . En cuanto al comportamiento de eosinófilos en estado basal no mostró cambios en las  $\mu\text{M}$  células entre grupos.

Se realizó un análisis para comparar si existía diferencia estadísticamente en cada una de las poblaciones celulares estudiadas en sujetos sanos, los datos se muestran en la **figura 10**.

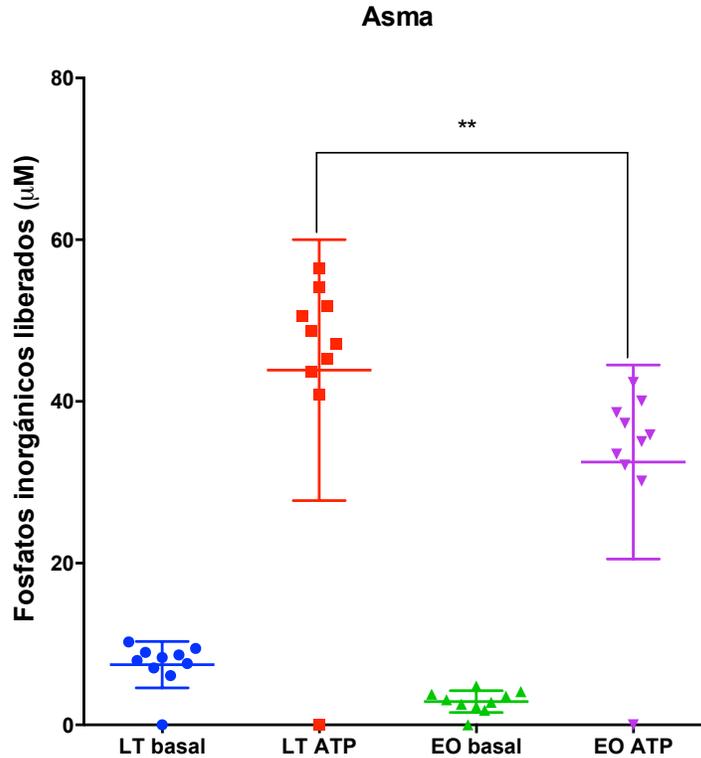


**Figura 10.** Distribución estadística de las concentraciones de  $P_i$  y comparativa entre leucocitos totales (LT) y eosinófilos (EO) de sujetos sanos.

\*\* $p < 0.001$  obtenida mediante la prueba U de Mann-Whitney

En la figura anterior se observa que existe diferencia estadística entre eosinófilos y leucocitos tratados con ATP ( $p < 0.001$ ). Se realizó también la comparación entre los estados basales de ambas poblaciones, sin embargo, no se encontró significancia estadística.

De igual manera que en el gráfico anterior, se realizó el análisis estadístico para ambas poblaciones estudiadas, pero ahora en pacientes con asma (**figura 11**).



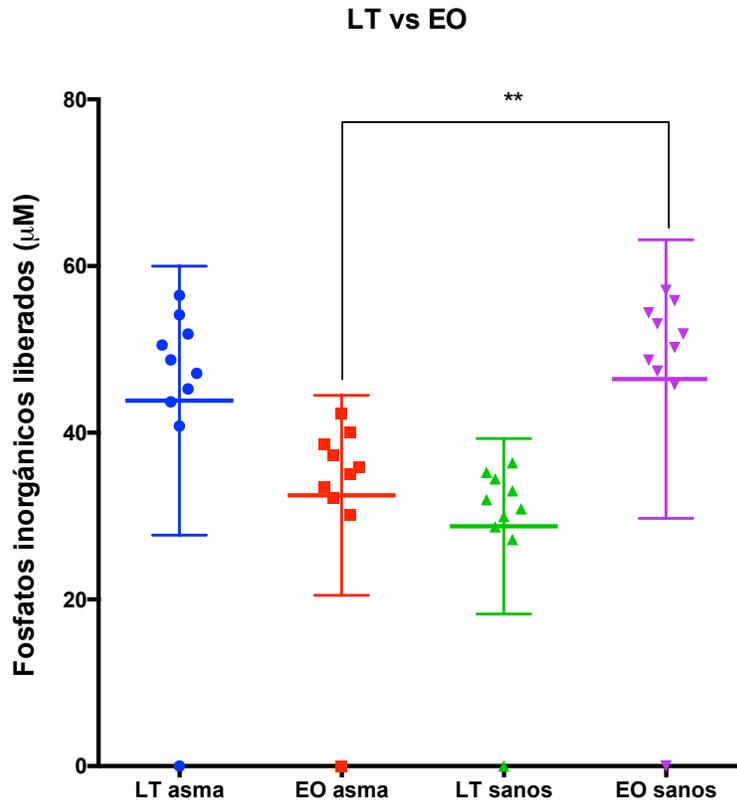
**Figura 11.** Distribución estadística de las concentraciones de  $P_i$  y comparativa entre leucocitos totales (LT) y eosinófilos (EO) de pacientes.

\*\* $p < 0.001$  obtenida mediante la prueba U de Mann-Whitney

En los datos encontrados de pacientes con asma se encontró que existía diferencia significativa entre los tratamientos con ATP y el estado basal de ambas poblaciones estudiadas ( $p < 0.001$ ), al igual que en los datos obtenidos en sujetos sanos. Se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ), en la comparación de leucocitos totales y eosinófilos estimulados con ATP a favor de leucocitos.

Al igual que con los sujetos sanos, no se encontró diferencia estadística en los estados basales de ambas poblaciones celulares estudiadas.

Se realizó una comparación entre grupos y entre las poblaciones que solo fueron estimuladas con ATP, ya que fueron las que mostraron diferencias. Los datos se muestran en la **figura 12**.



**Figura 12.** Distribución estadística de las concentraciones de  $P_i$  y comparativa leucocitos totales (LT) y eosinófilos (EO) estimulados con ATP de ambos grupos.  
 \*\* $p < 0.001$ . obtenida mediante la prueba U de Mann-Whitney

Se compararon las poblaciones celulares estimuladas de ATP de ambos grupos de estudio, encontrando diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) entre eosinófilos de sujetos sanos y leucocitos totales del mismo grupo. También se encontró diferencia con eosinófilos de pacientes.

De igual manera, la población de leucocitos totales de pacientes, mostraron diferencia estadísticamente significativa menor a  $p < 0.001$  con eosinófilos de ese mismo grupo de estudio y con leucocitos totales de sujetos sanos.

### **6.5. Esquema de tratamiento según el historial clínico**

Los datos generales mostrados en la **tabla 3** fueron obtenidos al momento de la toma de muestra, sin embargo, para ampliar la información acerca de los pacientes,

se hizo una búsqueda en los expedientes clínicos para saber cuál había sido el tratamiento que habían seguido durante su estancia en el INER, y posteriormente al haber sido dados de alta (**Tabla 6**). Los fármacos utilizados se dividieron en cuatro grupos: esteroides inhalados, esteroides no inhalados, broncodilatadores y otros. Las formulaciones que tuvieran más de dos principios activos se englobaron en el grupo correspondiente según su indicación médica.

**Tabla 6. Fármacos utilizados para el tratamiento de pacientes**

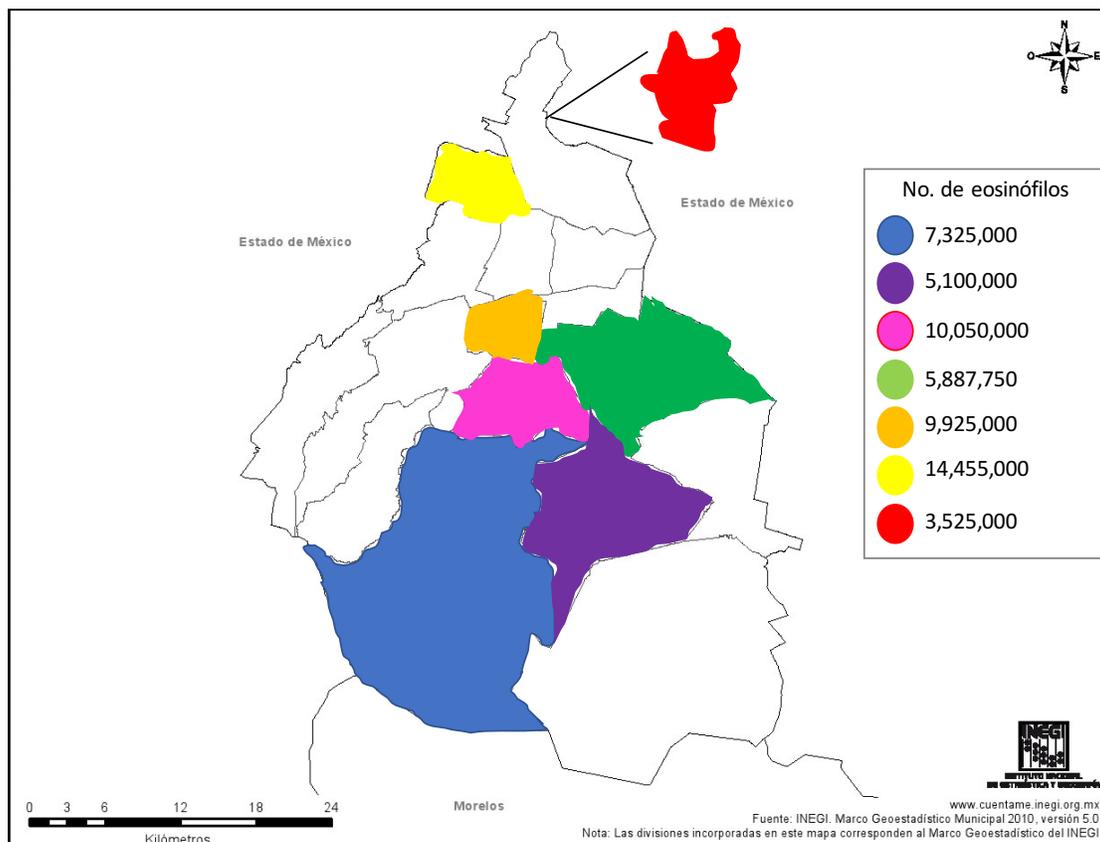
<b>Esteroides Inhalados</b>			<b>Broncodilatadores</b>		
Fármaco	Frecuencia	%	Fármaco	Frecuencia	%
Budesonida	3	42.86	Salbutamol	4	44.44
Budesonida/ Formoterol	2	28.57	Salbutamol/ Ipratropio	4	44.44
Fluticasona	1	14.29	Indacaterol/ Glicopirronio	1	11.11
Fluticasona/ Vilanterol	1	14.29			
<b>Esteroides no inhalados</b>			<b>Otros</b>		
Fármaco	Frecuencia	%	Fármaco	Frecuencia	%
Prednisona	2	100	Montelukast	3	100

En la tabla anterior, además de la clasificación de los fármacos utilizados para el tratamiento de los pacientes con asma, se muestran las frecuencias y porcentajes de cada uno de ellos, siendo el más utilizado el salbutamol, donde sabemos que es el medicamento de rescate de primera línea, o la mezcla con bromuro de ipratropio, lo cual lo pone como la principal opción para el tratamiento sintomático de la enfermedad en el apartado de broncodilatadores. También se muestra que el esteroide inhalado más recurrente es la budesonida recetada sola, o en combinación con formoterol. De la misma manera, se encontró que en tres ocasiones fue indicado un fármaco antagonista de receptores para leucotrienos como lo es Montelukast. Y finalmente en dos ocasiones fue administrado un

esteroide de manera intramuscular (prednisona 5-50 mg/día) correlacionando con pacientes cuya intensidad de la exacerbación asmática era de mayor grado.

### 6.6. Geolocalización de pacientes

Con la finalidad de encontrar la demarcación de residencia de cada paciente y relacionándolo con las delegaciones más contaminadas, se hizo una geolocalización para los meses de ingreso al servicio de urgencias. Mediante la consulta del expediente clínico se consultó el lugar de procedencia de los pacientes, así como el lugar actual de residencia y el número de ingresos que habían tenido a urgencias desde la apertura de su historial. Con estos datos se realizó la geolocalización y se obtuvo el promedio de eosinófilos con el objetivo de correlacionar el número de estas células con el lugar de residencia actual de los pacientes (**figura 13**).



**Figura 13.** Geolocalización de los pacientes reclutados y correlación del número de eosinófilos obtenido con la delegación o municipio de procedencia. (Mapa obtenido de INEGI, 2010)

Según lo obtenido por el expediente clínico, todos los pacientes reclutados provenían del Distrito Federal y municipios de la zona metropolitana, como se muestra en el mapa anterior, sin embargo, no existe correlación aparente entre el número promedio de eosinófilos y la zona geográfica de donde radicaban, ya que solo de tres delegaciones o municipios provenían más de un paciente, específicamente de delegaciones como Benito Juárez (3 pacientes), Iztapalapa y el municipio de Ecatepec (2 pacientes). La delegación de Xochimilco, Coyoacán, Tlalpan y Azcapotzalco solo tenían a un paciente en representación.

Con respecto a los datos obtenidos, se mostró que el mayor número de eosinófilos provenían un paciente de la delegación Azcapotzalco ( $14.45 \times 10^6$ ), mientras que el menor correspondió al número promedio de los pacientes procedentes del municipio de Ecatepec ( $3.5 \times 10^6$ ). También se puede observar que, en el Distrito Federal, el mayor número de eosinófilos corresponde a los pacientes ubicados entre la zona centro y hacia las delegaciones que están al norte de la ciudad, mientras que en las demás zonas no se observó una tendencia.

## 7. DISCUSIÓN

Existe la evidencia necesaria para determinar que los pacientes reclutados al estudio presentaban eosinofilia, una de las características ampliamente descritas como propias del asma alérgica (Korevaar et al., 2015) Esta determinación se hizo a través del conteo diferencial de células purificadas demostrando un aumento de eosinófilos en pacientes con respecto a los sujetos sanos, ya que los valores de estas células se encuentran muy por encima de los valores normales (Linnemann et al., 2017)

La cuenta realizada para determinar el número de células se realizó a partir de un volumen de 10 ml de sangre periférica, motivo por el cual, los valores en este estudio, se representan en millones de células por ml en lugar del conteo tradicional realizado a través de las biometrías hemáticas donde son representados por  $\mu\text{L}$ ; escala que también es utilizada por las guías internacionales y nacionales de asma donde se establece como valor normal un total de hasta 400 células por  $\mu\text{L}$  (Haughney et al., 2018). Sin embargo, el número promedio de células obtenidas de pacientes en este estudio fue de más del doble de ese valor normal antes mencionado.

Con respecto a la actividad enzimática, observamos que, de todas las poblaciones celulares provenientes de torrente sanguíneo, tentativamente, los eosinófilos son los encargados de la mayor parte de la actividad de esta enzima. Se realizaron ensayos para determinar si los neutrófilos también se veían involucrados con la hidrólisis de ATP, sin embargo, la actividad enzimática era menor a la de los eosinófilos y a la de leucocitos totales, no existiendo un cambio significativo (datos no mostrados) entre la concentración de fosfatos inorgánicos liberados por las células de sujetos sanos contra pacientes con asma. Esta mayor actividad enzimática por parte de los eosinófilos se puede explicar según lo mencionado por Alberto y cols. donde describen la variedad de receptores purinérgicos expresados en eosinófilos, específicamente P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub>, encargados de la señalización que promueve el incremento de calcio intracelular, la regulación de CD11b (integrina que promuévela adhesión y migración de leucocitos),

producción de especies reactivas de oxígeno, quimiotaxis, liberación de IL-8 y la proteína catiónica del eosinófilo, moléculas encargadas en la maduración, señalización y degranulación celular (Alberto et al., 2016).

De acuerdo al análisis estadístico realizado, se pudo determinar que los eosinófilos de pacientes con asma presentan una disminución en la actividad enzimática, ya que haciendo la comparación entre las poblaciones celulares estimuladas con la concentración de ATP de ambos grupos estudiados, se encontró una diferencia significativa mayor ( $p < 0.001$ ) a favor de la actividad de eosinófilos de sujetos sanos en contraste con la de pacientes con asma, incluso con la actividad de leucocitos totales de controles. Sin embargo, esta disminución en la actividad puede o no verse contrarrestada por el incremento en la cantidad de células durante el proceso inflamatorio, ya que como se registró anteriormente, se encontraron el doble de estas células en los pacientes con esta patología. No existe ningún antecedente directo respecto a la relación entre el aumento en el número de eosinófilos y la disminución de la actividad de la NTPDasa-1, por lo que esto podría ser un descubrimiento relevante en el desarrollo y progresión del asma alérgica.

Esta disminución en la actividad enzimática encontrada en el estudio, y la evidencia de la participación de los receptores P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub>, podrían orillar a pensar que probablemente pueda haber una disminución en la expresión de la NTPDasa-1 cuando la expresión de los receptores se ve incrementada durante el proceso inflamatorio (Alberto et al., 2016). Sin embargo, esto podría darse incluso desde el desencadenamiento de la señalización purinérgica.

El evidente menor número de monocitos en pacientes con respecto a sujetos sanos se puede explicar con lo mencionado por Vroman y su grupo, quienes exponen que los monocitos, bajo condiciones inflamatorias, pueden diferenciarse en células dendríticas derivadas de monocitos, activándose por la exposición al alérgeno. Esto podría indicar entonces, que está ya en proceso la activación de la vía T<sub>H</sub>2 por lo

que se está promoviendo la producción de IgE habiendo un mayor número de células presentadoras de antígenos (Vroman, Hendriks, & Kool, 2017).

El aumento en el número total de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos, en una patología como el asma alérgica, es considerado como parte del desarrollo de la enfermedad; debido al proceso inflamatorio presente. Sin embargo, particularmente los neutrófilos obtenidos, pudieran determinar la severidad de la exacerbación asmática, ya que como lo mencionan las guías para esta patología (Linnemann et al., 2017), (“Global Initiative for Asthma – GINA,” 2017), los valores altos de estas células son determinantes para colocar un estadificar en la categoría de moderada/severa (Yang et al., 2017), o que incluso poder determinar un tipo de asma como lo es la refractaria o resistente al tratamiento.

A partir de los datos obtenidos de los expedientes clínicos de cada paciente, se pudo observar que el esquema de tratamiento aplicado a cada uno de ellos dependía de la severidad de la exacerbación que presentaban, y también del apego al tratamiento que se les había dado anteriormente; así como también al del número de exacerbaciones por año que habían presentado. Sin embargo, a pesar de que cada paciente era tratado según su necesidad, el esquema de tratamiento farmacológico a seguir era el establecido por la guía internacional (“Global Initiative for Asthma – GINA,” 2017) y nacional (Linnemann et al., 2017) de manejo del asma. Se prescribía de manera inicial un corticoesteroide inhalado administrado en bajas dosis; siendo budesonida el más utilizado en estos pacientes. El tratamiento base se complementaba con un medicamento LABA según lo requerido por el paciente. Cabe mencionar que en la mayoría de los casos se administraba una terapia multifarmacológica debido a que se trataba de atacar a la enfermedad tanto sintomática como sistémicamente (Haselkorn et al., 2009), por lo que la combinación de fármacos recetada al ser dado de alta el paciente era común.

Referente a la geolocalización de los pacientes, se demostró que de la delegación Azcapotzalco provenía el sujeto quien presentó el mayor número de eosinófilos. Esto se puede relacionar a que, según el Sistema de Monitoreo Atmosférico de la Ciudad de México en su reporte anual del año 2016, la delegación Azcapotzalco fue

la más contaminada de diciembre de 2016 a mayo de 2017 (periodo donde se reclutaron a los pacientes) en cuestión de calidad de aire de toda la ciudad con más de 2.5 partículas suspendidas por billón (ppb) de monóxido de carbono. También aparecen las delegaciones de Iztapalapa, Benito Juárez y Tlalpan entre las más contaminadas (2 ppb) coincidiendo con ser las que, después de la delegación Azcapotzalco, presentan los valores promedios más altos de eosinófilos. (SIMAT, 2017)

Todos los datos obtenidos nos mostraron que al menos en la zona metropolitana, uno de los factores que pudieran ser desencadenantes para una exacerbación asmática pudiera ser la contaminación, ya que las zonas de donde provenían los pacientes son altamente urbanizadas e industrializadas en algunos casos (Anderson, Apter, Dutmer, Searing, & Szeffler, 2017). Sin embargo, la correlación que existe con la cantidad de eosinófilos pudiera deberse a muchos más factores, por ejemplo, el tiempo que el paciente lleva diagnosticado con la patología, debido a que había sujetos de diagnóstico nuevo como pacientes que llevaban hasta 20 años siendo tratados en el instituto.

La frecuencia en el número de exacerbaciones es sin duda otro de los factores que podría determinar el número elevado de eosinófilos, ya que había pacientes con menos de 3 años de diagnóstico que habían sido ingresados en más de 5 ocasiones debido al mal apego al tratamiento según lo reportado en los expedientes clínicos.

## 8. CONCLUSIONES

Este estudio sirvió para entender de una mejor manera el comportamiento y la participación de la NTPDasa-1 en una patología como el asma. Esta enzima, a pesar de ser ampliamente descrita ha sido poco estudiada tanto en modelos animales como en humanos, por lo que el tener un acercamiento mejor puede ayudar a determinar si es viable utilizarla como un blanco terapéutico en un futuro. La actividad de esta enzima en células directamente involucradas en el desarrollo del asma alérgica como son los eosinófilos, nos arrojó resultados importantes en cuanto a que dentro de la población celular total proveniente de sangre periférica circulatoria, estas células son responsables de hidrolizar la mayor cantidad de ATP extracelular presente, sin embargo, esta actividad se ve disminuida durante el proceso inflamatorio por lo que habría que comprobar mediante pruebas de biología molecular, si existe un cambio en la expresión de la enzima en ambos casos, en ausencia y presencia de la enfermedad.

Otra forma de darle mayor robustez al estudio sería realizar la cuantificación de la actividad enzimática tanto en eosinófilos como en demás células presentes en el proceso asmático, pero en muestras provenientes de lavado bronquioalveolar para obtener un acercamiento más acertado directamente en el sitio donde está el proceso inflamatorio y hacer comparaciones entre muestras.

## 9. REFERENCIAS

1. Alberto, A. V. P., Faria, R. X., De Menezes, J. R. L., Surrage, A., Da Rocha, N. C., Ferreira, L. G. B., ... Alves, L. A. (2016). Role of P2 Receptors as Modulators of Rat Eosinophil Recruitment in Allergic Inflammation. *PLoS ONE*, *11*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145392>
2. Alfieri, A., Parisi, A., Maione, F., Grassia, G., Morello, S., Lalenti, A., ... Cicala, C. (2012). Hyperresponsiveness to adenosine in sensitized Wistar rats over-expressing A1 receptor. *European Journal of Pharmacology*, *695*(1–3), 120–125.
3. Anderson, W. C., Apter, A. J., Dutmer, C. M., Searing, D. A., & Szeffler, S. J. (2017). Advances in asthma in 2016: Designing individualized approaches to management. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *140*(3), 671–680. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.06.015>
4. Barnes, P. J., & Adcock, I. M. (1998). Transcription factors and asthma. *Eur Respir J*, *12*, 221–234. <https://doi.org/10.1183/09031936.98.12010221>
5. Belvisi, M. G., Baker, K., Malloy, N., Raemdonck, K., Dekkak, B., Pieper, M., ... Birrell, M. A. (2018). Modelling the asthma phenotype: impact of cigarette smoke exposure. *Respiratory Research*, *19*(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0799-7>
6. Bermeo-Limon, A., & Velasco-Díaz, V. (2013). Guía para el tratamiento de la crisis asmática. *Archivos de Medicina de Urgencia de México*, *5*(2), 60–69.
7. Burnstock, G. (1981). Review lecture. Neurotransmitters and trophic factors in the autonomic nervous system. *The Journal of Physiology*, *313*, 1–35. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1981.sp013648>
8. Burnstock, G. (1991). Distribution and role of purinoceptor subtypes. *Nucleosides and Nucleotides*, *10*(5), 917–930.
9. Chávez, J., Vargas, M. H., Rebollar, D. C., Díaz, V., Cruz, J. E., Flores, E., ... Montaña, L. M. (2013). Inhibition of extracellular nucleotides hydrolysis intensifies the allergic bronchospasm. A novel protective role of ectonucleotidases. *Allergy*, *68*(4), 462–471.
10. Choy, D., Hart, K., Borthwick, L., Shikotra, A., Nagarkar, D., Siddiqui, S., ... Bradding, P. (2015). TH2 and TH17 inflammatory pathways are reciprocally regulated in asthma. *Science Translational Medicine*, *7*(301), 301ra–129.
11. Cockcroft, D. W., Hargreave, F. E., O'Byrne, P. M., & Boulet, L. P. (2007). Understanding allergic asthma from allergen inhalation tests. *Canadian Respiratory Journal*, *14*(7), 414–418.

12. Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S., & Annunziato, F. (2011). Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*, *66*(8), 989–998.
13. Fredholm, B. B. (2007). Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death and Differentiation*, *14*(7), 1315–1323.
14. Global Initiative for Asthma – GINA. (n.d.). Retrieved October 3, 2017, from <http://ginasthma.org/>
15. Grinthal, A., & Guidotti, G. (2006). CD39, NTPDase 1, is attached to the plasma membrane by two transmembrane domains. Why? *Purinergic Signalling*, *2*(2), 391–398.
16. Hammad, H., & Lambrecht, B. . (2006). Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *118*(2), 331–336.
17. Haselkorn, T., Fish, J. E., Zeiger, R. S., Szefer, S. J., Miller, D. P., Chipps, B. E., ... Bleecker, E. R. (2009). Consistently very poorly controlled asthma, as defined by the impairment domain of the Expert Panel Report 3 guidelines, increases risk for future severe asthma exacerbations in The Epidemiology and Natural History of Asthma: Outcomes and Treatment Regime. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *124*, 895–902.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.035>
18. Haughney, J., Morice, A., Blyth, K. G., Lee, A. J., Coutts, A., McKnight, E., & Pavord, I. (2018). A retrospective cohort study in severe asthma describing commonly measured biomarkers: Eosinophil count and IgE levels. *Respiratory Medicine*, *134*, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.12.001>
19. Holgate, S., & Polosa, R. (2008). Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*, *8*(3), 218–230.
20. Idzko, M., Hammad, H., van Nimwegen, M., Kool, M., Willart, M., Muskens, F., ... Lambrecht, B. N. (2007). Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nature Medicine*, *13*(8), 913–917.
21. Kelly, M., Hwang, J. M., & Kubes, P. (2007). Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007; *120*, 3–10. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *120*(1), 3–10.
22. Khakh, B. S., & North, R. A. (2006). P2X receptors as cell-surface ATP

sensors in health and disease. *Nature*, 442(3), 528–532.

23. Kobayashi, T., Kousaki, H., & Kita, H. (2010). Human eosinophils recognize endogenous danger signal crystalline uric acid and produce proinflammatory cytokines mediated by autocrine ATP. *The Journal of Immunology*, 184(11), 6350–6358.
24. Korevaar, D. A., Westerhof, G. A., Wang, J., Cohen, J. F., Spijker, R., Sterk, P. J., ... Bossuyt, P. M. M. (2015). Diagnostic accuracy of minimally invasive markers for detection of airway eosinophilia in asthma: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 3(4), 290–300. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00050-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00050-8)
25. Linnemann, D., Salas, Hernández, J., Vázquez, García, J., Ortiz, ... Be. (2017). Mexican Asthma Guidelines: GUIMA 2017 Guía Mexicana del Asma: GUIMA 2017. *Rev Alerg Mex Guía Mexicana Del Asma Rev Alerg Mex*, 64(1), 11–128. Retrieved from <http://www.revistaalergia.mx>
26. Lister, M. F., Sharkey, J., Sawatzky, D. A., Hodgkiss, J. P., Davidson, D. J., Rossi, A. G., & Finlayson, K. (2007). The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation. *Journal of Inflammation*, 4(1), 5.
27. Maazi, H., Shirinbak, S., Willart, M., Hammad, H., Cabanski, M., Boon, L., ... van Oosterhout, A. (2012). Contribution of regulatory T cells to alleviation of experimental allergic asthma after specific immunotherapy. *Clin Exp Allergy*, 42(10), 1519–1528.
28. Morgan, W. J., Crain, E. F., Gruchalla, R. S., O'Connor, G. T., Kattan, M., Evans, R., ... Mitchell, H. (2004). Results of a Home-Based Environmental Intervention among Urban Children with Asthma. *New England Journal of Medicine*, 351(11), 1068–1080. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032097>
29. Munkonda, M. N., Kauffenstein, G., Kukulski, F., Léveque, S. A., Legendre, C., Pelletier, J., ... Sévigny, J. (2007). Inhibition of human and mouse plasma membrane bound NTPDases by P2 receptor antagonists. *Biochemical Pharmacology*, 74, 1524–1534.
30. Myers, T. R. (2000). Pediatric asthma epidemiology: incidence, morbidity, and mortality. *Respiratory Care Clinics of North America*, 6(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S1078-5337\(05\)70054-X](https://doi.org/10.1016/S1078-5337(05)70054-X)
31. North, R. A. (2002). Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiological Reviews*, 82(4), 1013–1067. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>
32. OMS | Asma. (2013). WHO. Retrieved from <http://www.who.int/respiratory/asthma/es/>
33. Palmqvist, C., Wardlaw, A. J., & Bradding, P. (2007). Chemokines and their

receptors as potential targets for the treatment of asthma. *British Journal of Pharmacology*, 151(6), 725–736.

34. Palmqvist, M., Persson, G., Lazer ++, L., Rosenborg, J., Larsson, P., & Lötvall, J. (1997). Inhaled dry-powder formoterol and salmeterol in asthmatic patients: onset of action, duration of effect and potency. *Eur Respir J*, 10, 2484–2489. <https://doi.org/10.1183/09031936.97.10112489>
35. Paniagua, N., Lopez, R., Muñoz, N., Tames, M., Mojica, E., Arana-Arri, E., ... Benito, J. (2017). Randomized Trial of Dexamethasone Versus Prednisone for Children with Acute Asthma Exacerbations. *The Journal of Pediatrics*, 191, 190–196.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2017.08.030>
36. Pease, J. E., & Williams, T. J. (2006). The attraction of chemokines as a target for specific anti-inflammatory therapy. *British Journal of Pharmacology*, 147(1), 212–221.
37. Peters, M. C., Nguyen, M.-L. T., & Dunican, E. M. (2016). Biomarkers of Airway Type-2 Inflammation and Integrating Complex Phenotypes to Endotypes in Asthma. *Current Allergy and Asthma Reports*, 16(10), 71. <https://doi.org/10.1007/s11882-016-0651-4>
38. Prieto, M., & Queipo, A. (2000). Caracterización del asma bronquial en un área de salud. *Med Gen Integr*, 16((4)), 356–359.
39. Programa Nacional de Población 2001-2006 | Consejo Nacional de Población CONAPO. (n.d.). Retrieved October 3, 2017, from <http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/2001-2006>
40. Robson, S. C., Sévigny, J., & Zimmermann, H. (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling*, 2(2), 409–430.
41. Rossi, L., Salvestrini, V., Ferrari, D., Di Virgilio, F., & Lemoli, R. (2017). The sixth sense: hematopoietic stem cells detect danger through purinergic signaling. *Blood Journal*, 120(12), 2365–2375.
42. Sandoval-Benetti, C. ., Sánchez, C. ., Baleirón, M. ., Bogado, M. A., & Romero-Valdez, J. . (2010). Eosinofilia pulmonar. *Revista de Posgrado de La Vía Cátedra de Medicina*, 200.
43. SIMAT. (2017). Informe de la Calidad del Aire 2016. Retrieved March 5, 2018, from [http://www.aire.cdmx.gob.mx/descargas/publicaciones/flippingbook/informe\\_anual\\_calidad\\_aire\\_2016v1/mobile/index.html](http://www.aire.cdmx.gob.mx/descargas/publicaciones/flippingbook/informe_anual_calidad_aire_2016v1/mobile/index.html)
44. Suadicaní, S. O., Brosnan, C. F., & Scemes, E. (2006). P2X7 receptors

mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca<sub>2</sub> signaling. *Journal of Neuroscience*, 26(5), 1378–1385.

45. The Global Asthma Report 2014. (n.d.). Retrieved June 7, 2018, from <http://globalasthmareport.org/about/about.php>
46. Trautmann, A. (2009). Extracellular ATP in the immune system: more than just a “danger signal”. *Science Signaling*, 2(56), pe6. <https://doi.org/10.1126/scisignal.256pe6>
47. Vroman, H., Hendriks, R. W., & Kool, M. (2017). Dendritic Cell Subsets in Asthma: Impaired Tolerance or Exaggerated Inflammation? *Frontiers in Immunology*, 8, 941. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00941>
48. Wang, L., Tang, P., Shi, C., Wan, Y., Tang, W., Hou, X., ... Tao, Q. (2014). Expression of CD39 mRNA is altered in the peripheral blood of patients with allergic asthma. *Biomedical Reports*, 2(1), 75–78.
49. Weigand, L., Ford, A., & Bradley, J. (2012). A role for ATP in bronchoconstriction-induced activation of guinea pig vagal intrapulmonary C-fibres. *The Journal of Physiology*, 590(16), 4109–4120.
50. Wiley, J. S., Sluyter, R., Gu, B. J., Stokes, L., & Fuller, S. J. (2011). The human P2X7 receptor and its role in innate immunity. *Tissue Antigens*, 78(5), 321–332.
51. Yang, T., Li, Y., Lyu, Z., Huang, K., Corrigan, C., Ying, S., ... Wang, C. (2017). Characteristics of Proinflammatory Cytokines and Chemokines in Airways of Asthmatics: Relationships with Disease Severity and Infiltration of Inflammatory Cells. *Chinese Medical Journal*, 130(17), 2033. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.213428>
52. Zerneck, A., Bidzhekov, K., Ozüyan, B., Fraemohs, L., Liehn, E. A., Lüscher-Firzlaff, J. M., ... Weber, C. (2006). CD73/Ecto-5'-Nucleotidase Protects Against Vascular Inflammation and Neointima Formation. *Circulation*, 113(17), 2120–2127. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.595249>