



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

GALECTINA 10 EN ENFERMEDAD RESPIRATORIA
EXACERBADA POR ASPIRINA

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

CARLA YONELI JIMÉNEZ TORRES



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Rebecca Elizabeth Franco y Bourland

VOCAL: Enrique Ortega Soto

SECRETARIO: María Cristina Negrete García

1er. SUPLENTE: José Pedraza Chaverri

2° SUPLENTE: Gibran Pérez Montesinos

Este trabajo experimental fue realizado en el Departamento de Inmunoalergia y asma del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Ismael Cosío Villegas.

ASESOR:

María Cristina Negrete García

SUSTENTANTE:

Carla Yoneli Jiménez Torres

Agradecimiento especial

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser orgullosamente parte de esta gran comunidad.

A la Facultad de Química por ser mi segunda casa.

Al CONACYT por la beca otorgada.

A Dios por darme la oportunidad de vivir y por haberme cumplido este sueño.

A Cristina Negrete García por la confianza, las enseñanzas y sobre todo por darme animo en los momentos en los que pensé en darme por vencida.

A Rosalía Montes por sus consejos y apoyo sobre todo en los tiempos difíciles.

A la señora Paty por ser una gran persona y por su ayuda.

Al Dr. Luis Manuel Terán y al Dr. Juan Velázquez por su ayuda y apoyo.

A mis amigos y compañeros del laboratorio por hacer de mi estancia una experiencia inolvidable, por sus consejos y por su compañía en momentos difíciles.

A mis amigos del laboratorio de Oncología Biomédica por su ayuda, consejos y por hacer mi estancia en el INER divertida, pero sobre todo por su amistad.

A mis amigos de la facultad quienes hicieron que el largo camino para llegar a este momento fuera menos pesado gracias a su compañía, a las experiencias vividas, a su apoyo y comprensión, pero sobre todo a su gran amistad.

A la pequeña Liz por ser la mejor amiga que pude haber tenido. Por su incondicional apoyo, por sus consejos, por enseñarme que siempre se debe tener esperanza aun cuando se cree que todo está perdido, por enseñarme a ser una mejor persona y por aceptarme con mis errores.

Dedicada a...

Mis papás por confiar siempre en mí, por sus desvelos, por su gran amor a pesar de mis defectos, por los consejos, por levantarme las veces que he caído, por ser quien soy, pero sobre todo por ser maravillosas personas a las que AMO y de las que estoy muy orgullosa.

A mi hermana Viridiana por ser una amiga incondicional, por cuidarme, por escucharme, por sus consejos, por su apoyo y cariño, y por ser una gran mujer a la que admiro y quiero mucho.

A mi hermano Carlos por su apoyo en los momentos buenos y malos, por su cariño y por hacerme la vida muy divertida con sus ocurrencias, pero sobre todo por ser un gran niño al que quiero mucho y del que estoy muy orgullosa.

Cuando la vida te presente razones para llorar...

... demuéstrale que tienes muchas razones para reír.

Abreviaturas

EREA	Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina
AINES	Anti inflamatorios no esteroideos
AIA	Asma inducida por aspirina
ASA	Asma sensible a aspirina
HIA	Hipersensibilidad a aspirina
IL	Interleucina
GM-CSF	Factor estimulante de colonias macrófagos y granulocitos
COX	Ciclooxigenasa
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF	Factor de necrosis tumoral
DRC	Dominio de reconocimiento a carbohidratos
CLC	Cristales de Charcot Leyden
ATA	Asmáticos tolerantes a la aspirina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FEV	Volumen espiratorio forzado
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
BSA	Albumina sérica bovina

Índice

Abreviaturas	7
Resumen	11
1. Antecedentes	12
2. Introducción	13
2.1 Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina ----	13
2.1.1 Generalidades y prevalencia	13
2.1.2 Patogénesis	14
2.1.3 Metabolismo del ácido araquidónico	16
2.1.4 Diagnóstico	16
2.2 Eosinófilos	17
2.2.1 Morfología	18
2.2.2 Ciclo de vida del eosinófilo	18
2.2.3 Funciones	20
2.3 Galectinas	20
2.3.1 Generalidades	20
2.3.2 Clasificación de las galectinas	21
2.3.3 Funciones y localización	22
2.4 Características generales de galectina-10	23
2.4.1 Estructura	25
3. Justificación	27

4. Objetivos	28
4.1 Objetivo general	28
4.2 Objetivos particulares	28
5. Metodología	29
5.1 Grupos de estudio	30
5.2 Lavado nasal pre y pos reto nasal con lisil-aspirina ----	30
5.3 Purificación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)	31
5.4 Extracción de ARN total de CMSP	32
5.5 Síntesis de ADN complementario	33
5.6 Expresión génica de galectina-10 por PCR tiempo real --	34
5.7 Purificación de eosinófilos	35
5.8 Electroforesis y Western blot	35
5.9 Detección de galectina-10 por ELISA	37
6. Análisis estadístico	38
7. Resultados	38
7.1 Datos demográficos	38
7.2 Resultados de la expresión génica de galectina-10 por PCR tiempo real	39
7.3 ELISA para galectina-10	41
7.4 Resultados del Western blot	46

8. Discusión	-----	47
9. Conclusiones	-----	51
10. Bibliografía	-----	52
11. Apéndice	-----	58

Resumen

La Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina (EREA) es un padecimiento poco estudiado que se caracteriza por presentar asma, intolerancia a la aspirina, rinosinusitis crónica y poliposis nasal. En el presente trabajo de tesis, analizamos tanto la expresión génica como la expresión proteica de galectina-10 en lavados nasales pre y pos reto nasal con lisil-aspirina, principal componente de los gránulos de eosinófilos y basófilos, y proteína recientemente involucrada en procesos alérgicos como la rinitis alérgica. La expresión fue determinada en tres grupos de estudio, pacientes con EREA, asmáticos tolerantes a la aspirina (ATA) y controles sanos. En condiciones basales y después del reto con la lisil-aspirina, los pacientes con EREA presentaron mayor nivel de galectina-10 comparados con los ATA y los voluntarios sanos, en contraste con la expresión génica encontrada. Este es el primer estudio donde se reporta la liberación de galectina-10 en pacientes con EREA en lavados nasales, y de acuerdo a nuestros resultados suponemos una posible participación de ésta proteína en la patogénesis de esta enfermedad.

Palabras clave: EREA, galectina-10, ATA.

1. Antecedentes

El hallazgo de la enfermedad actualmente conocida como Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina (EREA) (1) se logró gracias a las observaciones que se hicieron a un grupo de pacientes asmáticos que presentaban diferentes alteraciones clínicas, de las cuales destacaban el angioedema, urticaria y broncoconstricción entre algunas otras más, después de ingerir aspirina o algún anti inflamatorio no esteroideo (AINES).

En la EREA no se conoce el o los mecanismos que participan en la exacerbación de la enfermedad después de la ingesta de aspirina, sin embargo el que hasta hoy se propone con mayor aceptación es el que involucra diferentes anomalías en el metabolismo del ácido araquidónico, provocando un desequilibrio entre los distintos mediadores proinflamatorios y anti inflamatorios (1). Sin embargo, existen algunas otras propuestas que han tratado de explicar el origen y las diferentes consecuencias de éste padecimiento, sin llegar a una conclusión general.

Este padecimiento es poco conocido y por lo tanto poco estudiado, sin embargo en un estudio (2) hecho por genómica en sangre periférica de pacientes con EREA, se demostró que hay una sobre expresión del gene que codifica para glectina-10. De igual forma, hay otras investigaciones realizadas por proteómica en lavados nasales y en piel de pacientes, pero con rinitis alérgica, donde se destacó la expresión proteica de glectina-10 (3, 4). En cada uno de los reportes mencionados sólo se ha manifestado la sobreproducción de ésta proteína, pero en ninguno de ellos se le ha atribuido alguna función biológica clara.

De aquí que el objetivo principal de nuestro trabajo fue estudiar la presencia de glectina-10 en lavados nasales de sujetos con EREA antes y después de un reto nasal

con lisil-aspirina, y analizar si ésta proteína se encuentra involucrada en este síndrome cuando dichos pacientes son retados con el agente desencadenante.

2. Introducción

2.1 Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina (EREA)

2.1.1 Generalidades y prevalencia

La EREA (Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina), fue descrita por primera vez por Widal en 1922, quién hizo la asociación clínica entre hipersensibilidad a la aspirina, poliposis nasal y asma (5).

Posteriormente en 1968 Samter y Beer publicaron los primeros trabajos sobre ésta asociación, a la cual le denominaron “Triada de Samter” ó “Síndrome de Samter”. Actualmente, este síndrome también es conocido como asma inducida por aspirina (AIA), asma sensible a aspirina (ASA), hipersensibilidad a aspirina (HIA) o EREA (1).

La EREA, es un padecimiento caracterizado por inflamación severa y persistente de las vías respiratorias superiores e inferiores, rinosinusitis hipereosinofílica hiperplásica, asma, poliposis nasal e intolerancia a la aspirina (1). Se ha reportado que afecta alrededor del 10% de la población asmática adulta y se puede incrementar hasta el 20% cuando los pacientes son retados con el agente desencadenante, el ácido acetil salicílico (6).

Los sujetos con esta enfermedad no sólo presentan intolerancia a la aspirina, algunos también son intolerantes a algunos analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), lo cual les puede provocar rinorrea profusa, hiperemia conjuntival, dolor abdominal, urticaria, angioedema y shock anafiláctico. Este tipo de reacciones pueden aparecer a los 30 minutos de haber ingerido estos medicamentos o hasta 3 horas después (6, 7).

A diferencia del asma este padecimiento se presenta entre los 29 y 34 años, iniciándose en las mujeres a una edad más temprana con respecto a los hombres (5).

2.1.2 Patogénesis

La EREA es una enfermedad inflamatoria caracterizada por hipertrofia del músculo liso bronquial, secreciones excesivas de moco e inflamación, proceso en el cual participan diferentes células activadas como mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, basófilos y linfocitos. Estos pacientes presentan un estado de inflamación continua de vías respiratorias altas y bajas y la exposición a la aspirina acentúa el proceso inflamatorio y conduce a las exacerbaciones del asma (7).

Los procesos asmáticos que desarrollan este tipo de enfermos presentan predominantemente una respuesta tipo T_H2 , en la cual tanto el equilibrio de subpoblaciones de linfocitos T cooperadores, como el de las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias es vital para el control de la respuesta inflamatoria, la desregulación en este mecanismo, conduce al desarrollo de condiciones patológicas tales como autoinmunidad e inflamación crónica (8).

En lo que concierne a la EREA, se han observado niveles incrementados de citocinas proinflamatorias secretadas por células epiteliales y linfocitos T_H2 activados. Dentro de las cuales se encuentran IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF y eotaxina (1).

En las últimas décadas se han realizado diversos estudios para conocer los mecanismos involucrados en la fisiopatología de la intolerancia a la aspirina. A la fecha se sabe que esta reacción no es mediada por IgE (5), sin embargo, no se conocen los mecanismos por los cuales se produce la reacción de intolerancia a la aspirina.

Una de las propuestas más estudiadas es la que se refiere a la existencia de un metabolismo anormal del ácido araquidónico (9), y un incremento en la actividad de la leucotrieno sintasa (LTC_4S), lo que ocasiona una sobre producción de cisteinil

leucotrienos (CysLTs) como LTC_4 , LTD_4 y LTE_4 y un decremento en el nivel de la prostanglandina anti inflamatoria PGE_2 (ver fig. 1), ocasionando un desequilibrio entre los distintos mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios y un aumento en el número de eosinófilos y mastocitos a nivel tisular, lo que genera procesos de vasodilatación, broncoconstricción y secreción de moco, características importantes de la EREA (7).

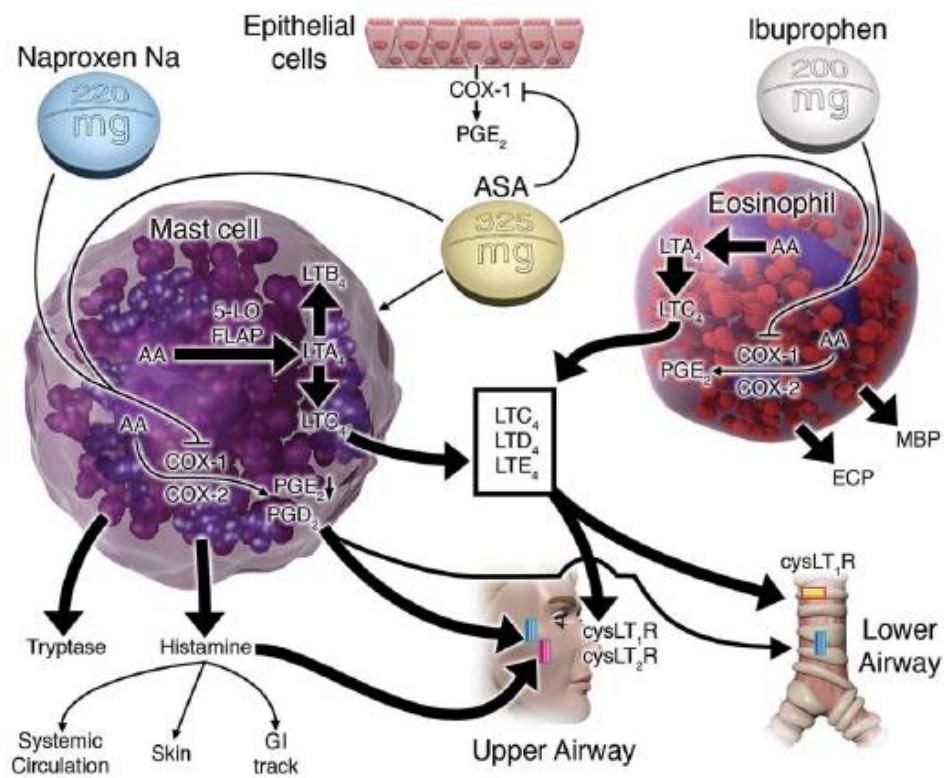


Figura 1. Mecanismo propuesto, por el cual se produce la intolerancia a la aspirina. Metabolismo anormal del ácido araquidónico, ocasionando un incremento en los niveles de cisteinil leucotrienos y un decremento en el nivel de PGE_2 .

2.1.3 Metabolismo del ácido araquidónico

El ácido araquidónico puede ser metabolizado a través de 2 vías, la de la cicloxigenasa (COX) para producir prostanglandinas y la de 5-lipoxigenasa (5-LO) para sintetizar leucotrienos (1). La cicloxigenasa tiene dos isoformas cicloxigenasa 1 (COX-1) y cicloxigenasa 2 (COX-2) (7).

COX-1 es una enzima expresada constitutivamente en células epiteliales del sistema gastrointestinal, respiratorio y en células inflamatorias. COX-2 se expresa únicamente en células inflamatorias, es una enzima inducible y altamente regulada por mediadores pro inflamatorios tales como citocinas y factores de crecimiento (1).

La aspirina y otros AINES inhiben la COX-1, compiten directamente con el ácido araquidónico por el sitio de unión de la cicloxigenasa, lo que provoca un decremento en los productos sintetizados por esta enzima, incluyendo PGE₂ la cual inhibe a la enzima 5-LO, por lo cual aumenta la producción de leucotrienos (9).

2.1.4 Diagnóstico

Hasta el momento la principal herramienta de diagnóstico sigue siendo los signos y síntomas de la EREA que manifiestan los pacientes, como son: asma, poliposis nasal, intolerancia a la aspirina (AINES), y sinusitis crónica hipereosinofílica hiperplásica. Sin embargo, un diagnóstico definitivo y veraz, solamente puede ser establecido a través de retos con aspirina.

Hay tres tipos de reto con aspirina: oral, bronquial y nasal. El reto oral es considerado el estándar de oro, y se practica principalmente en Estados Unidos. Por otra parte el reto con inhalación bronquial con aspirina es utilizado principalmente en Europa (1). El reto nasal con aspirina es simple, seguro y el más inocuo ya que raramente induce broncoespasmo (7).

El reto nasal se realiza comúnmente instilando 25mg de lisil-aspirina en cada narina (10), se ha observado que los pacientes con EREA no experimentan ataques de asma durante el reto sólo presentan síntomas nasales tales como rinorrea, congestión nasal y estornudos. La mayor ventaja de este reto es que no provoca broncoespasmo en sujetos intolerantes a la aspirina y que puede ser empleado incluso en sujetos con obstrucción bronquial. Las desventajas son que la sensibilidad se reduce cuando es comparado con retos orales y que en algunos pacientes la oclusión por pólipos nasales interfiere con el flujo nasal haciendo imposible la realización del reto (1, 6).

A continuación se presenta un cuadro donde se pueden identificar las diferencias en sensibilidad y especificidad de los diferentes retos con aspirina:

Tipo de reto	Reto con Lisil-Aspirina	
	Sensibilidad	Especificidad
Oral	89%	93%
Inhalado	77%	93%
Intranasal	80%	92.5%

2.2 Eosinófilos

Los eosinófilos fueron descritos en sangre en 1879 por el científico alemán Paul Ehrlich (11). Son leucocitos polimorfonucleares involucrados en el inicio y propagación de numerosos procesos inflamatorios que pueden ser provocados por parasitosis, infecciones bacterianas y virales, daño tisular y enfermedades alérgicas (12).

El incremento de eosinófilos en tejidos, sangre y médula ósea es característico del asma. En general, los números elevados de ésta estirpe celular correlacionan con la gravedad de la enfermedad. Esto ha llevado a la hipótesis de que el eosinófilo es la

célula efectora central responsable de la inflamación en curso de las vías respiratorias, debido a su potencial para causar daño a las mucosas mediante la liberación de proteínas de sus gránulos, mediadores lipídicos y especies reactivas de oxígeno (12).

Estas características no solo pueden presentarse en asma sino también en otros padecimientos relacionados con esta enfermedad como la EREA.

2.2.1 Morfología

Morfológicamente los eosinófilos se caracterizan por tener núcleo bilobulado con citoplasma casi totalmente ocupado por gránulos de tres tipos: gránulos primarios, gránulos grandes o específicos también llamados secundarios y gránulos pequeños.

Los gránulos primarios no tienen núcleo, contienen lisofosfolipasa A y galectina-10; los gránulos específicos están formados por un núcleo cristalinoide y contienen 4 proteínas catiónicas eosinófilas básicas: proteína básica principal (MBP), proteína catiónica eosinofílica (ECP), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) y peroxidasa de eosinófilo (EPO). Por último los gránulos pequeños contienen arilsulfatasa B y fosfatasa ácida (13).

Como parte de la morfología normal también contienen cuerpos lipídicos que son la fuente principal de ácido araquidónico; además contienen ciclooxigenasa y 5-lipoxigenasa, necesarias para la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos (14).

2.2.2 Ciclo de vida del eosinófilo

El desarrollo de eosinófilos en la médula ósea es estimulado por 3 citocinas: factor estimulante de colonias macrófagos y granulocitos (GM-CSF), IL-3 e IL-5. La IL-5 promueve exclusivamente el desarrollo y diferenciación terminal de eosinófilos en la médula ósea, en contraste con IL-3 y GM-CSF que además de estimular el desarrollo de eosinófilos también estimulan otros tipos celulares (13).

Los eosinófilos liberados en sangre normalmente circulan con una vida media que puede variar desde 8 a 18 horas, posteriormente dejan la circulación para localizarse en los tejidos donde permanecen por 2 o 5 días, especialmente en tejidos con superficies epiteliales mucosas como la piel, tracto respiratorio y digestivo (13).

Para desarrollar una respuesta inflamatoria efectiva los eosinófilos primero deben estimularse, un proceso por el cual las funciones efectoras tales como migración, adhesión y fagocitosis son incrementadas, después tienen que ser activados para liberar sus mediadores (13).

La activación del eosinófilo se da por acción de estímulos específicos como la unión de IgA a los receptores de superficie del eosinófilo. Una vez activados, los eosinófilos presentan modificaciones estructurales y metabólicas como la aparición de vacuolas ligadas a la liberación de los gránulos al medio extracelular (degranulación) y el aumento de cuerpos lipídicos. En la siguiente figura se muestra el ciclo de vida completo del eosinófilo (14).

1. Eosinofiloipoyesis. El eosinófilo maduro es derivado de la célula madre pluripotencial por medio de IL-5 en la médula ósea.
 2. Anclaje del endotelio. El eosinófilo maduro migra a través del vaso sanguíneo por los procesos de rodamiento, adhesión y diapédesis a los tejidos inflamados con participación de las moléculas de adhesión VLA-4/VCAM-1, producidas por IL-4 y IL-13 derivadas del patrón Th2.
 3. Quimiotaxis. El eosinófilo se dirige al tejido inflamado por medio de eotaxina y PAF y prolonga su supervivencia en los tejidos por medio de IL-3, IL-5 y GM-CSF, si estas citocinas no están presentes se produce muerte del eosinófilo.
 4. Degranulación y liberación de mediadores químicos.

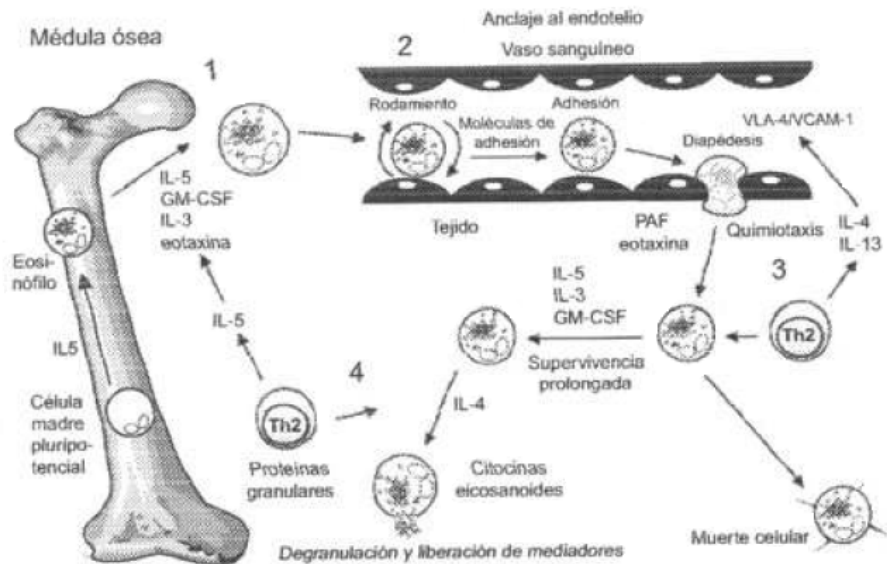


Figura 2. Ciclo de vida del eosinófilo. Modificado de Hoffman (14).

2.2.3 Funciones

Los eosinófilos tienen la capacidad de participar en la reparación y remodelación tisular (liberando TGF- β), juegan un papel importante en la regulación de su ciclo de vida y poseen función citotóxica (por sus proteínas granulares) e inmunoreguladora (por las citocinas que liberan) (14). Son potentes productores de metabolitos tóxicos derivados de oxígeno tal como O_2^- , H_2O_2 y OH^- (11).

Pueden sintetizar y secretar por lo menos 35 importantes citocinas proinflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento. Entre las citocinas se encuentran IL- 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 13, 16, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), factor estimulante de colonias macrófagos y granulocitos (GM-CSF), quimiocinas como RANTES (CCL5) y eotaxina (CCL11), y factores de crecimiento como factor de activación plaquetario (PAF) y factor de crecimiento transformante α/β (TGF α/β), entre otros. Muchas de estas citocinas son potentes inductores de la respuesta inmune en asma, rinitis y otras enfermedades inflamatorias como la EREA (12).

Por otra parte un componente primordial de los gránulos de eosinófilos es la proteína galectina-10. Comprende del 7 al 10 % del total de las proteínas presentes en los eosinófilos y debido a su abundante expresión se le considera marcador de este tipo celular (15). Esta proteína pertenece a la familia de lectinas animales llamadas galectinas.

2.3 Galectinas

2.3.1 Generalidades

Las galectinas son una familia de proteínas endógenas conservadas a través de la evolución, están ampliamente distribuidas en la naturaleza en invertebrados y mamíferos (16), por lo general son proteínas pequeñas solubles con pesos moleculares de 14-35kD (21); tienen la capacidad de unirse a su ligando mediante un dominio de

reconocimiento a carbohidratos (DRC) que tiene afinidad por residuos β -galactósidos (8). El DRC consiste en alrededor de 135 amino ácidos plegados en una estructura de sándwich (17).

Estas proteínas pueden interactuar con superficies celulares y glicoconjugados de matriz extracelular a través de interacciones galectina-carbohidrato (18).

2.3.2 Clasificación de las galectinas

De acuerdo a su estructura se han descrito 15 miembros de familia de galectinas en mamíferos (18). Hirabayashi y Kasai las clasificaron en 3 grupos: Grupo I) Las proto tipo, Grupo II) Las tipo quimera y Grupo III) Las de secuencias repetidas o en “tandem” (17).

Las galectinas proto tipo (galectina 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 y 15) presentan un solo DRC y algunos miembros de este grupo pueden formar dímeros (8). Las galectinas 5, 7 y 10 existen como monómeros y las galectinas 1, 2, 13 y 14 forman dímeros (19). El grupo de galectinas tipo quimera está conformado únicamente por galectina 3; presenta un DRC conectado a una región amino terminal que no reconoce carbohidratos (8) y puede formar pentámeros (18). Por último, las galectinas con secuencias repetidas (galectina 4, 6, 8, 9 y 12), son proteínas con dos dominios de reconocimiento a carbohidratos diferentes.

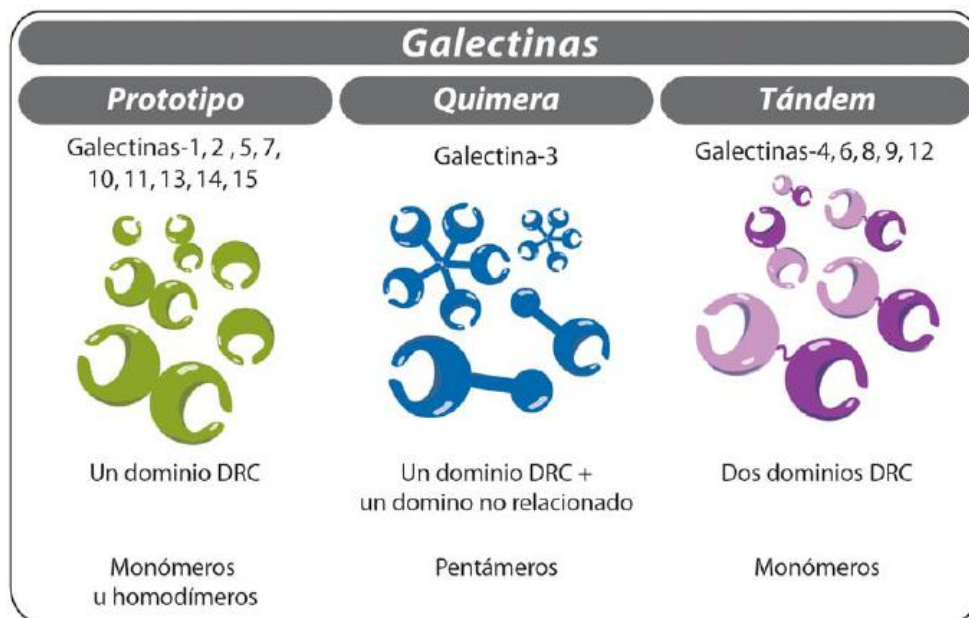


Figura 3. Clasificación de las galectinas de acuerdo a su estructura (20).

2.3.3 Funciones y localización

La galectina 1 y 3 fueron las primeras en aislarse de tejidos de mamíferos (21). Las galectinas en general son expresadas en células mieloides y pueden ser inducidas o encontrarse poco expresadas en células linfoides en reposo. En cuanto a las galectinas 4 y 7, a la fecha no se han encontrado expresadas en ningún tipo celular. Algunas otras, como la galectina 1 y 3 son expresadas simultáneamente en diferentes tipos de células del sistema inmune como en células T y macrófagos (18).

Algunos miembros de esta familia se pueden localizar intracelularmente (galectina 1, 3, 7, 10, 11 y 12), y algunos otros, se localizan tanto intracelular como extracelularmente (galectinas 2 y 4) (22).

Existen evidencias donde se demuestra que algunos miembros de esta familia participan activamente en procesos de regulación de la respuesta inmune, como mediadores de la inflamación tanto aguda como crónica (23). Además han sido involucradas en fenómenos de inmunomodulación, adhesión celular, regulación del

crecimiento, embriogénesis, reproducción, metástasis, proliferación y splicing. La mayoría de estas funciones, han sido asignadas a galectina 1 y galectina 3 (16, 22).

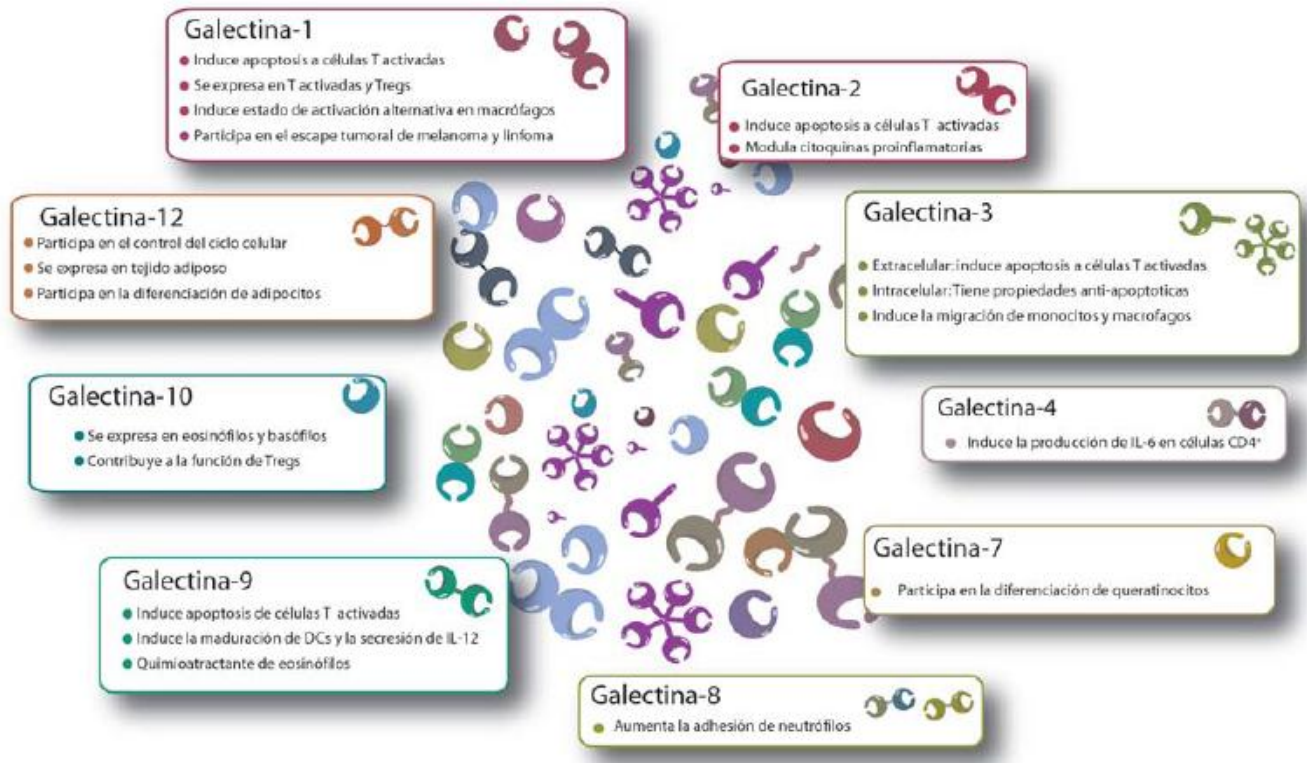


Figura 4. Función de Galectinas (20).

En cuanto a galectina-10, a la fecha no se le conoce alguna función biológica, sólo existen algunos datos sobre su expresión en rinitis alérgica (3, 4).

2.4 Características generales de galectina-10

Los cristales de Charcot-Leyden son cristales bipirámidales hexagonales formados por una proteína a la que se le denominó proteína de los cristales de Charcot-Leyden, la cual actualmente es conocida como galectina-10.

Galectina-10 se encuentra expresada en los gránulos de eosinófilos y basófilos, y puede localizarse en núcleo y citoplasma (17). Comprende del 7 al 10 % del total de las proteínas presentes en eosinófilos y debido a su abundante expresión se le considera marcador de este tipo celular (15). Originalmente se le denominó cristales de Charcot-Leyden (CLC), los cuales fueron descritos por primera vez en 1853 por Charcot y en 1871 por Leyden (15, 24).

Inicialmente esta proteína fue considerada como lisofosfolipasa de eosinófilos, sin embargo años después, Ackerman y cols. (25) demostraron que desarrolla esta función pero de forma indirecta. Ya en 1995 se observó que la secuencia y estructura de la proteína CLC era similar al grupo de las galectinas, por ésta razón y por el orden numérico que le correspondía, fue denominada galectina-10 (26). El gen que codifica para la galectina-10 se encuentra localizado en el cromosoma 19 ubicación 19q 13.1 (27).

No se le ha atribuido alguna función biológica clara, sin embargo, Kubach y cols., (28) son los únicos que han demostrado que ésta proteína es esencial para la función de las células T reguladoras $CD4^+CD25^+$ de sujetos sanos. Por otro lado se han dado a conocer investigaciones donde resaltan la sobre expresión de galectina-10 en rinitis alérgica (3, 4).

Ghafouri y cols., (3) realizaron proteómica de lavados nasales de pacientes con rinitis alérgica y una de las proteínas sobre expresadas en estos sujetos fue galectina-10. Este estudio fue el primero en el cual se reportó una sobre expresión de galectina-10 en lavados nasales de pacientes con rinitis alérgica. Por otra parte Benson y cols., (4) hallaron por microarreglos una sobre expresión del gen de galectina-10 en biopsias de piel de pacientes con rinitis alérgica. Años más tarde Bryborn y cols., (29) estudiaron la asociación de polimorfismos en el gene de galectina-10 en ésta misma enfermedad, y encontraron que la variación genética en la región promotora del gene de galectina-10 está asociada con este proceso alérgico.

Recientemente Plager y cols., (2010), (30) estudiaron los genes sobre expresados en pacientes con rinosinusitis asmática crónica con pólipos nasales, uno de ellos fue la galectina-10, además reportaron un nivel elevado de ésta proteína en lavados nasales de estos mismos pacientes con respecto a los controles.

Por otra parte Valli De Re y cols., (31) demostraron por primera vez relación directa entre los niveles de galectina-10 y el grado en el daño al intestino en enfermedad celiaca (enfermedad crónica intestinal).

2.4.1 Estructura

La galectina-10 es un polipéptido de 16 kDa con 142 aminoácidos (25), tiene un alto contenido de ácido glutámico y metionina, pero únicamente seis residuos de arginina y dos de cisteína (32). La secuencia de aminoácidos de galectina-10 muestra mayor similitud con galectina 3 y 4 (25-30%); y presenta una baja similitud con galectina 1 y 2 (15-20%) (26).

La galectina-10 es una molécula compacta, presenta una estructura de gelatina (jelly-roll), la cual resulta de la asociación entre 5 cadenas y 6 cadenas β -plegadas (25, 26). Tiene afinidad específica por sacáridos simples como N-acetil-D-glucosamina, lactosa y manosa (26).

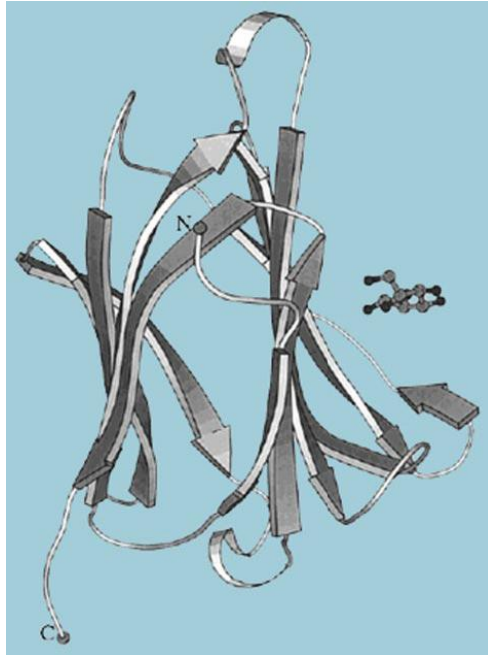


Figura 5. Representación de listón de la estructura de galectina-10. La manosa (molécula a la derecha) interactúa con los residuos His 55, Asn 65, Trp 72 y Gln 75 dentro del dominio de reconocimiento a carbohidratos.

Cuando esta proteína es liberada de los eosinófilos forma agregados que toman la forma distintiva de cristales con forma bipirámidal hexagonal, como se muestra en la figura 6. Estos cristales se pueden teñir con hematoxilina-eosina (se tiñen de rosa a rojo), con fierro-hematoxilina (se tiñen de negro) y con Giemsa (se tiñen de azul) (33).

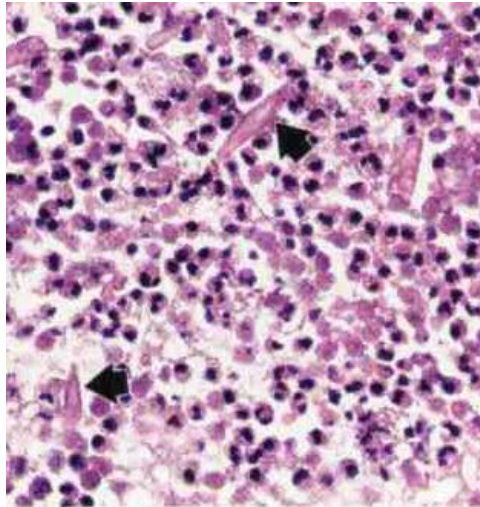


Figura 6. Secreciones purulentas de los senos esfenoides con alto contenido de cristales de Charcot-Leyden (en las flechas) tinción H&E.

3. Justificación

La EREA es un padecimiento poco estudiado del cual no se conoce el o los mecanismos que participan en la exacerbación de la enfermedad después de la ingesta de aspirina, aunque hasta hoy el de mayor aceptación es el que involucra diferentes anomalías en el metabolismo del ácido araquidónico, provocando un desequilibrio entre los distintos medidores proinflamatorios y antiinflamatorios sintetizados (1).

Como ya se había mencionado existe un estudio (2) en el que por genómica en sangre periférica de pacientes con EREA, se demostró una sobre expresión del gene de galectina-10, y algunas otras investigaciones realizadas por proteómica en lavados nasales y en piel de pacientes con rinitis alérgica donde se destacó la expresión proteica de galectina-10 (3, 4); pero en cada uno de los reportes mencionados sólo se ha manifestado la sobreproducción del gen o de la proteína, pero en ninguno de ellos le describieron alguna función biológica clara.

Tomando en cuenta que la EREA es un síndrome en el cual destaca la exacerbación y la gravedad del asma por intolerancia a la aspirina, y por ende un padecimiento con procesos inflamatorios crónicos graves, se nos hizo relevante averiguar inicialmente si la galectina-10 podría ser considerada como un marcador diagnóstico de la EREA y segundo, investigar si se encuentra involucrada en el desarrollo de la patogenésis de este padecimiento. Por lo que nuestro principal objetivo fue, evaluar la presencia de galectina-10 en lavados nasales de sujetos con EREA antes y después de un reto nasal con lisil-aspirina.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

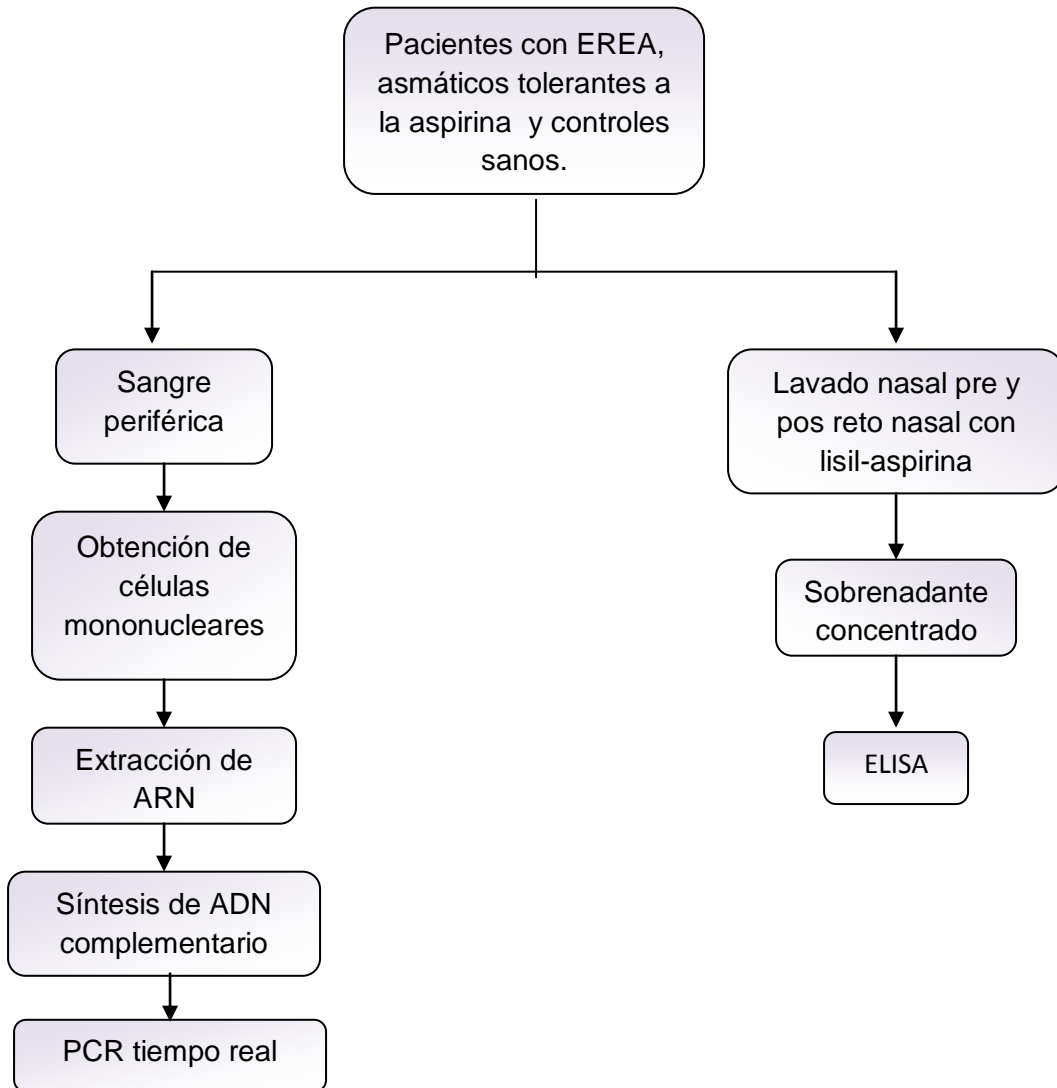
Analizar la expresión de galectina-10 en CMSP y la presencia de la proteína en lavados nasales pre y pos reto nasal con lisil-aspirina.

4.2 Objetivos particulares

- Comparar la expresión génica de galectina-10 por PCR tiempo real en CMSP de pacientes con EREA, asmáticos tolerantes a la aspirina y controles sanos.
- Determinar la presencia de galectina-10 en lavados nasales pre y pos reto nasal con lisil-aspirina por ELISA.
- Analizar los resultados de los pacientes con EREA, con respecto a los asmáticos tolerantes a la aspirina y a los controles sanos .
- Determinar si existe relación entre la inmunoreactividad de galectina-10 y la severidad de la EREA.

5. Metodología

Los siguientes esquemas muestran la metodología desarrollada en este trabajo:



5.1 Grupos de estudio

Se incluyeron 3 grupos de estudio: 1) 15 pacientes con Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina (EREA), 2) 10 pacientes asmáticos tolerantes a la aspirina (ATA) y 3) 15 controles sanos. Se extrajeron 15mL de sangre periférica de cada uno de los sujetos del grupo de estudio, para el análisis de expresión génica de galectina-10. Posteriormente, a todos y cada uno de ellos, se les realizó un lavado nasal pre y pos reto nasal con lisil-aspirina en solución salina fisiológica (34), los cuales fueron usados para la detección de galectina-10 por ELISA.

Los criterios de inclusión fueron: pacientes mexicanos con diagnóstico de EREA, ATA y sujetos voluntarios sanos sin síntomas respiratorios, sin historia de asma o intolerancia a la aspirina y sujetos con un FEV mayor al 75%. Todos los sujetos del grupo de estudio fueron reclutados y clasificados por el grupo de la clínica de inmunología y asma del INER, el cual cuenta con médicos especializados en el área. El reto nasal con la lisil-aspirina para el diagnóstico de EREA, se detalla en seguida, el cual también se realizó por los médicos especialistas en el campo.

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

5.2 Lavado nasal pre y pos reto nasal con lisil-aspirina

Se realizó rinomanometría y espirometría basal a todos los pacientes. Se instiló 0.1mL de solución salina 0.9% en cada narina y se realizó nuevamente rinomanometría para descartar hiperreactividad inespecífica. Una vez descartada la hiperreactividad inespecífica se realizó el lavado nasal correspondiente al pre reto nasal, con una sonda foley, instilando 5mL de solución salina 0.9% en cada narina. Después se instilaron 0.25mL de una solución de lisil-aspirina en cada narina, correspondientes a 12.5mg de lisil-aspirina, se realizó rinomanometría y espirometría 20 y 30 minutos posterior a la instilación. El reto se considerará positivo si se observa disminución del 40% del flujo

inspiratorio nasal con respecto al basal y/o una caída del FEV1 en un 20%, si no es así se vuelve a instilar en cada narina la misma dosis. Se realiza nuevamente rinomanometría y espirometría 20 y 30 minutos posterior a la instilación y se realiza el lavado nasal con 5mL de solución salina 0.9% en cada narina, correspondiente al pos reto nasal.

Los lavados nasales se centrifugaron para separar las células del sobrenadante y este se almacenó a -70°C hasta su requerimiento.

5.3 Purificación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

Para la separación de las CMSP se tomaron 15 mL de sangre periférica y se diluyó volumen a volumen en PBS. El volumen total se transfirió lentamente a un tubo cónico de 50mL con 10mL de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep™) teniendo cuidado de no romper el gradiente formado.

Se centrifugó (centrifuga HERMLE Z323K) a 1200 rpm durante 45 minutos a 22° C. Tras la centrifugación la muestra se separó en las siguientes fases: la primera fase correspondiente al plasma seguida de una interfase debida a las células mononucleares; una segunda fase debida al Ficoll y la fase inferior correspondiente a eritrocitos y granulocitos (ver figura 7).

La capa de células mononucleares se transfirió cuidadosamente con una pipeta Pasteur a un tubo cónico, después se realizaron dos lavados con aproximadamente 40 ml de PBS centrifugando a 1200 rpm durante 10 minutos a 4° C cada vez. Una vez realizado el último lavado se decantó el sobrenadante, se resuspendieron las células en el líquido remanente y se contaron en una cámara de Neubauer (BRAND); después se adicionó la cantidad correspondiente de Trizol (Gibco brl) de acuerdo a la relación 1 mL Trizol / 5 -10x10⁶ células. Finalmente se agitaron vigorosamente las muestras para lisar las células y se almacenaron a -70° C hasta su requerimiento.

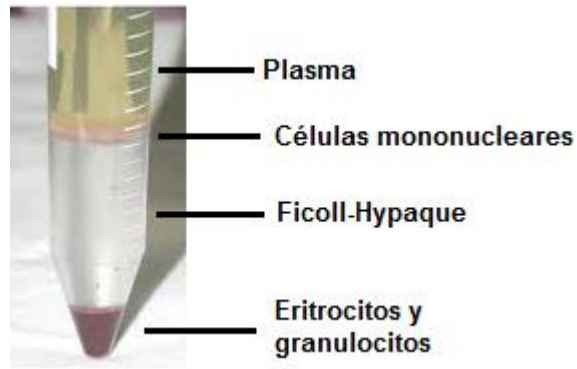


Figura 7. Purificación de células mononucleares de sangre periférica con Ficoll-Hypaque.

5.4 Extracción de ARN total de CMSP

Esta técnica se realizó tomando máximas precauciones, empleando material libre de RNasas y se trabajó lo más rápido posible para evitar la degradación del ARN durante la manipulación.

Se descongelaron las muestras de CMSP en Trizol, se agitaron vigorosamente y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó 0.2mL de cloroformo por cada mililitro de Trizol, agitando los tubos vigorosamente por 15 segundos e incubando 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugo (centrifuga HERMLE Z323K) a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 ° C.

Tras la centrifugación la mezcla se separó en dos fases, la primera correspondiente a la fase acuosa en la cual se encuentra el ARN, seguida de una interfase en la que se encuentran las proteínas y la segunda fase correspondiente a fenol / cloroformo (figura 8).



Figura 8. Separación de la mezcla células en Trizol + cloroformo, después de la centrifugación.

La fase acuosa se transfirió con mucho cuidado a un tubo nuevo libre de RNasas, el ARN se precipitó de esta fase con alcohol isopropílico, utilizando 0,5 mL de alcohol isopropílico por 1mL de Trizol. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugo a 12000 rpm durante 10 minutos a 4° C.

Después de la centrifugación se eliminó el sobrenadante, y el precipitado de ARN formado se lavó una vez con etanol al 75% en agua DEPC, añadiendo 1 mL de etanol al 75% en agua DEPC por cada mililitro de Trizol. Se mezcló la muestra y se centrifugo a 7500 rpm durante 5 minutos a 4 ° C. Después de la centrifugación se eliminó el sobrenadante, se dejó secar al aire el precipitado de ARN y se resuspendió en 100µL de agua DEPC. La integridad y calidad del ARN fue evaluada en el equipo Agilent 2100 Bionalyzer.

5.5 Síntesis de ADN complementario

La síntesis de ADN complementario se realizó con el Kit ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen), en el equipo Mastercycler gradient (Eppendorf) a partir de 1µg de ARN en un volumen total de 20µl. Para cada muestra se empleó: 1µl de Oligo(dT)₂₀ (50µM), 2µl de mezcla de dNTPs (10mM) y H₂O DEPC para tener un volumen de 12µl, incubando a 65° C durante 5 minutos y enfriado inmediatamente sobre hielo para evitar la renaturalización. Después se adicionaron 8µl de la mezcla de reacción a cada

muestra conteniendo 4µl de buffer de síntesis de ADN complementario 5x, 1µl de DTT (0.1M), 1µl de RNaseOUT (40U/µl), 1µl de H₂O DEPC y 1µl de ThermoScript RT (15U/µl), incubando a 60° C durante 45 minutos; la reacción se detuvo por incubación a 85° C por 5 minutos.

Finalmente se adiciono 1µl de RNasa H para eliminar el ARN remanente y se incubo a 37° C por 20 minutos. El ADN complementario de cada muestra se almaceno a -70° C hasta su requerimiento.

5.6 Expresión génica de galectina-10 por PCR tiempo real

La secuencia del gen de galectina-10 se obtuvo de la base de datos pubmed (35), y los primers y la sonda se diseñaron de tal forma que fueran específicos para el gen de interés.

Primero se realizó una curva de validación para el gen de galectina-10 y el gen constitutivo 18s, a partir de diluciones seriales de un ADN complementario estándar para verificar que tanto el gen de interés como el constitutivo amplifican con la misma eficiencia.

La curva de validación y las muestras de ADN complementario de cada grupo de estudio se amplificaron en un volumen total de reacción de 20µl, adicionando a cada muestra 10µl de Taqman Universal Master Mix II with UNG (Applied Biosystem), 1µl de la sonda para galectina-10 (Custom TaqMan Gene Expresión Assays, Applied Biosystems), y 4µl de agua grado biología molecular. Las muestras se corrieron en el equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem), con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 50° C por 2 min; seguido de 1 ciclo a 95° C por 10 min; terminando con 40 ciclos a 95° C por 15 seg y 60° C por 1 min.

Se realizó una cuantificación relativa usando como grupo de referencia los sujetos sanos, los resultados se analizaron con el software ABI PRISM 7700 Sequence Detection System.

5.7 Purificación de granulocitos

Para la purificación de granulocitos se tomaron 20mL de sangre periférica de un paciente con eosinofilia, y se diluyeron con dextran 9:2. Se transfirió la sangre mezclada con dextran a una jeringa de 60mL, se invirtió la jeringa y se dejó en esa posición por 15 minutos para que las células rojas sedimentaran. Una vez transcurrido el tiempo, se extrajo el plasma rico en leucocitos con una aguja de mariposa a un tubo cónico de 50mL conteniendo 15mL de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep™). Se centrifugó (centrifuga HERMLE Z323K) a 1500 rpm a temperatura ambiente por 25 minutos, tras la centrifugación la muestra se separó en 3 fases; la fase superior correspondiente al plasma y la fase inferior debida al Ficoll, en el fondo del tubo se formó un precipitado de eritrocitos y granulocitos, principalmente eosinófilos. Se descartó el plasma y el Ficoll completamente, teniendo cuidado con el precipitado formado y se limpió el tubo cónico de forma ascendente con un hisopo de algodón para remover contaminación de células mononucleares. El precipitado se resuspendió con el líquido remanente, se adicionaron 5mL de agua desionizada fría para lisar los eritrocitos, se invirtió el tubo varias veces y se adiciono rápidamente PBS hasta llenar el tubo. Después se centrifugó inmediatamente a 3000 rpm por 5 minutos a 4° C, se decantó el sobrenadante y se lisaron los eosinófilos con 500µl de buffer de lisis (Tris 2M pH 7.5, NaCl 0.15M, NaF 0.05M). Finalmente se centrifugó a 13500 rpm por 1 minuto a 4° C, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, se determinó la cantidad de proteínas con Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific) y el sobrenadante restante se guardó a -70° C.

5.8 Electroforesis y Western blot

Esta técnica se realizó para detectar la posible presencia de galectina-10 a nivel local en pólipos y mucosa nasal de pacientes con EREA. Las muestras de pólipo y mucosa

nasal se lisaron con solución de lisis (Tris 2M pH 7.5, NaCl 0.15M, NaF 0.05M), después se centrifugó (centrifuga HERMLE Z323K) a 13500 rpm por 1 minuto a 4° C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo.

Se determinó la cantidad de proteínas de los sobrenadantes con Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific), se transfirió el volumen necesario para tener una cantidad de 30µg de proteínas de cada sobrenadante a un tubo nuevo y se adicionó un volumen equivalente de buffer de carga (Laemmli Sample Buffer, BIO-RAD), las proteínas se desnaturalizaron por incubación a 94° C por 10 min.

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), (36) el gel se preparó al 15%, después de cargar las muestras y el control positivo usado (enriquecido de eosinófilos), la corrida se realizó en una cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN Tetra System (BIO-RAD) a 80V constante, en solución amortiguadora para electroforesis (25 mM Tris; 192 mM Glicina; 0,1% SDS, pH 8.3) durante 3h aproximadamente o hasta que el frente alcanzará la parte final del gel.

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron utilizando una cámara vertical Mini-PROTEAN Tetra System (BIO-RAD) a una membrana de nitrocelulosa (BIORAD). Este dispositivo permite transferir las proteínas cargadas negativamente, mediante una corriente eléctrica que moviliza a las proteínas desde el gel hacia la membrana. Para ello se utilizó solución amortiguadora para transferencia (25 mM Tris pH 8,3; 192 mM Glicina; 10% Metanol) y la misma se realizó a 70V constante durante 2.30 horas. Después, la membrana se incubó con 10mL de solución bloqueadora (PBS / 0.1% Tween 20 / 3% albúmina sérica bovina, BSA) toda la noche a 4° C con agitación constante, para evitar la unión inespecífica del anticuerpo anti-galectina-10.

La membrana bloqueada se lavó con 10mL de solución de lavado (PBS / 0.1% Tween 20) y se incubó a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal anti-galectina (Abcam) diluido 1:200 en solución bloqueadora, durante 2h. Después las membranas

se lavaron y se incubaron con el anticuerpo anti-ratón biotinilado (Sigma) diluido 1:5000 en solución bloqueadora por 1h. Se realizaron 3 lavados y se adicionó Estreptavidina-Peroxidasa (Sigma) 1:1000 en solución bloqueadora, después se incubó por 1h a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 3 lavados y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos con diaminobencidina (DAB, Vector) para revelar.

5.9 Detección de galectina-10 por ELISA

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos para ELISA (Costar). Se sensibilizaron las placas toda la noche a temperatura ambiente con 100µl de anticuerpo monoclonal anti-galectina 10 (Abcam) diluido 1:100 en PBS. Después las placas se lavaron 5 veces con 300µl de solución de lavado (PBS pH 7.4 / 0.05% Tween 20) en cada pozo y se bloquearon con 300µl de solución bloqueadora (PBS - 0.05% Tween 20 / 1% albúmina sérica bovina, BSA) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados con solución de lavado y se incubaron por triplicado 100µl de los lavados nasales previamente concentrados en tubos Amicon Ultra-4 (Millipore), toda la noche a temperatura ambiente. Se realizaron nuevamente 5 lavados y se adicionaron 100µl del anticuerpo policlonal anti-galectina-10 (R & D) con una dilución 1:100 en solución bloqueadora, incubando por 2 horas a temperatura ambiente. Después de 5 lavados se adicionó el anticuerpo anti-cabra biotinilado 1:300 en solución bloqueadora (2h; temperatura ambiente). Se realizaron 5 lavados y se adicionó Estreptavidina-Peroxidasa (Sigma) 1:1000 en solución bloqueadora, por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 5 lavados y se procedió al revelado con una solución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB, Sigma) incubando a temperatura ambiente por 30 min. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 0.19M y se leyó la absorbencia a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro de placas (Benchmark BIO-RAD).

6. Análisis estadístico

Se empleó la prueba U de Mann Whitney para comparar la diferencia entre las medias de los resultados usando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad software, Inc. California, USA). Se estableció diferencia estadísticamente significativa, si $p < 0.05$.

7. Resultados

7.1 Datos demográficos:

	Sanos	ATA	EREA
Sujetos (n)	15	10	15
Edad (años)	23 (21 - 34)	39 (14 - 62)	47 (28 - 74)
Sexo M:F	8:7	4:6	2:13
Atopia (%)	0	30	47
Eosinófilos de sangre periférica ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0.17 ± 0.16	0.52 ± 0.26	$0.50 \pm 0.42^*$
IgE (UI/mL)	76.8 ± 65.4	229.5 ± 438.2	267.8 ± 320.7
Reto nasal con lisil-aspirina (+)	0	0	15

Tabla 2. Datos demográficos de los pacientes con EREA, Asmáticos Tolerantes a la Aspirina (ATA) y sujetos sanos. * $P > 0.05$ (EREA vs ATA).

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la expresión génica de galectina-10 por PCR tiempo real y la determinación de esta proteína por la técnica de ELISA:

7.2 Resultados de la expresión génica de galectina-10 por PCR tiempo real

La expresión génica de galectina-10 se determinó solo en el estado basal, de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Se calculó por el método $\Delta\Delta C_t$, tomando como referencia a los controles sanos. Este método es válido cuando la eficiencia de amplificación del gene de interés (galectina-10) y endógeno es similar (18s) (37), como ocurrió para nuestro ensayo.

La figura 9 representa la expresión relativa de galectina-10 en pacientes asmáticos tolerantes a la aspirina (ATA) tomando como referencia a los sujetos sanos.

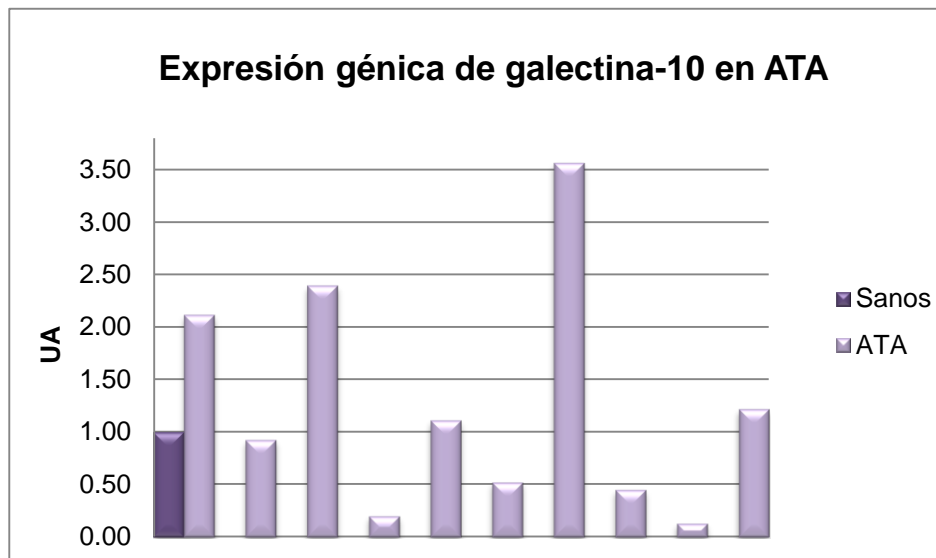


Figura 9. Expresión relativa de galectina-10 en sangre periférica de pacientes asmáticos tolerantes a la aspirina (ATA).

Como se puede observar en la figura anterior, los pacientes ATA presentaron un comportamiento heterogéneo, ya que la mitad de estos sobre expresa el gene de interés y el resto lo sub expresa comparándolos con los controles sanos.

En cambio los pacientes con EREA presentaron un comportamiento más homogéneo debido a que la mayoría de estos sub expresa galectina-10 con respecto a los controles sanos (Figura 10).

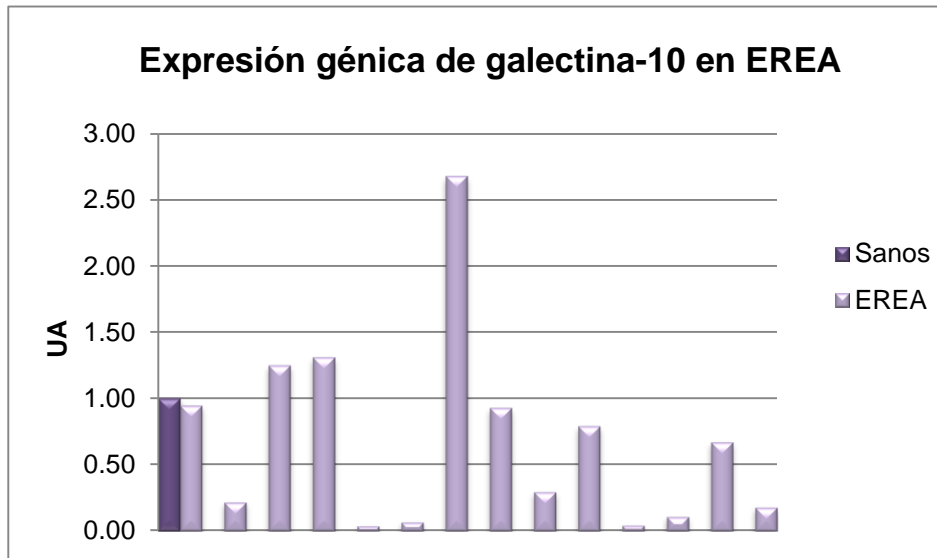


Figura 10. Expresión relativa de galectina-10 en sangre periférica de pacientes con EREA.

La figura 11 muestra la expresión génica promedio de galectina -10 en los grupos de estudio, de igual forma que en las gráficas anteriores la unidad representa la expresión génica de galectina-10 del grupo de controles sanos. Se observó que los pacientes con EREA sub-expresan el gene de galectina-10 con respecto a los controles sanos, siendo significativa esta diferencia ($p < 0.05$). Al comparar este mismo grupo con los ATA se observó que también expresaron menos veces el gene de galectina-10, sin embargo esta diferencia no fue significativa ($p > 0.05$).

En cuanto a los ATA, estos presentaron un incremento en la expresión de galectina-10 con respecto al grupo de controles sanos, aunque este incremento no fue significativo ($p > 0.05$).

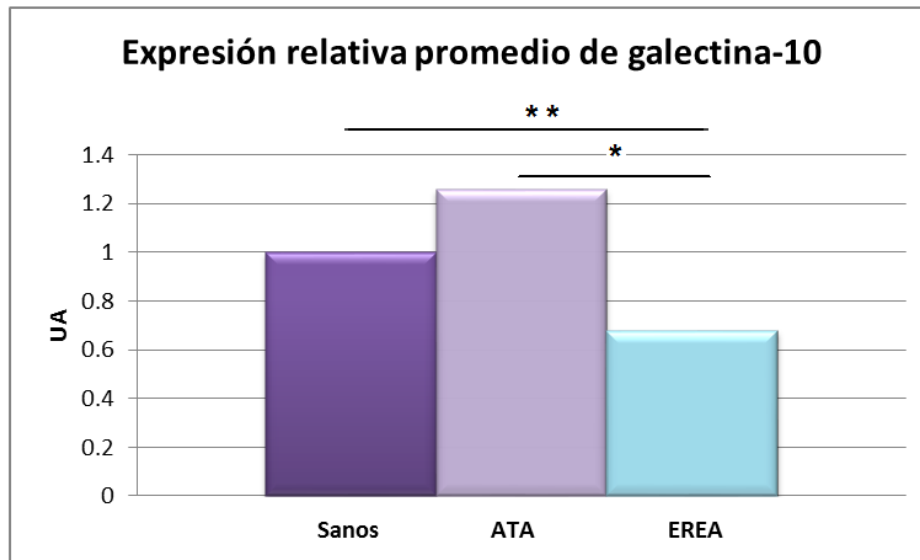


Figura 11. Expresión relativa promedio de galectina-10 en pacientes con EREA (0.681 ± 0.733) y ATA (1.262 ± 1.107). ** $p < 0.05$, * $p > 0.05$.

7.3 ELISA para galectina-10

Se estandarizo un ELISA tipo sándwich, anteriormente ya descrito, para la detección de galectina-10 en lavados nasales pre y pos reto nasal con lisil-aspirina debido a que no existe un kit comercial.

La figura 12 muestra los resultados de ELISA, para galectina-10 en estado basal (pre reto) en los diferentes grupos de estudio.

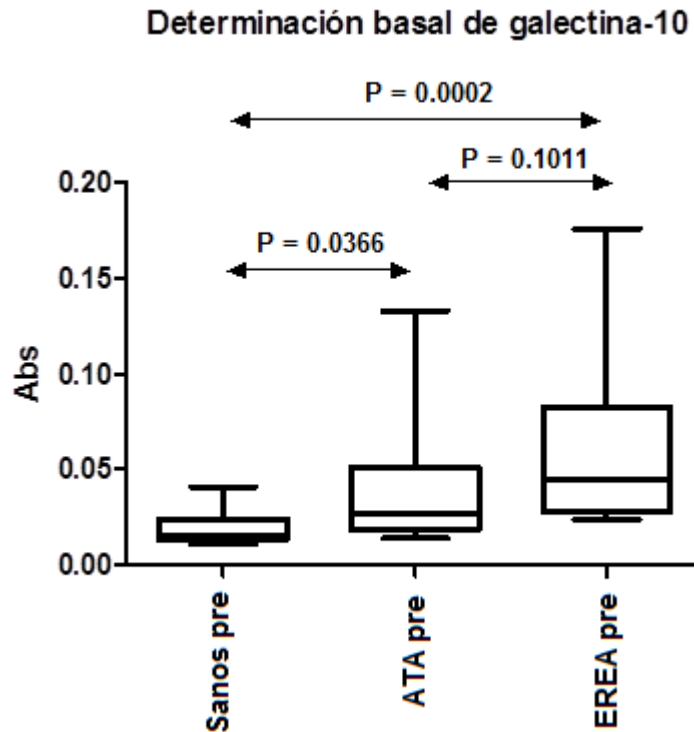


Figura 12. Inmunoreactividad basal de galectina-10 en EREA y ATA comparados con los controles sanos.

En condiciones basales, tanto los pacientes con EREA (0.045 ± 0.046 vs 0.015 ± 0.010 , $P < 0.0005$) como los ATA (0.027 ± 0.039 vs 0.015 ± 0.010 , $P < 0.05$), presentaron mayor inmunoreactividad de galectina-10 con respecto a los controles sanos, siendo más significativa la diferencia entre el grupo de EREA y sanos ($P < 0.0005$).

El nivel de galectina-10 fue mayor en lavados nasales basales de pacientes con EREA, contrario a lo que se encontró en la expresión del gene en CMSP por PCR tiempo real.

Por otro lado al comparar la inmunoreactividad basal de galectina-10 entre los grupos de EREA y ATA no se encontró diferencia significativa (0.045 ± 0.046 vs 0.027 ± 0.039 , $P > 0.05$), lo que nos señala una expresión basal similar de galectina-10 en los lavados nasales de ambos grupos.

La figura 13 muestra los resultados de ELISA para galectina-10 correspondientes al pos reto nasal en los diferentes grupos de estudio.

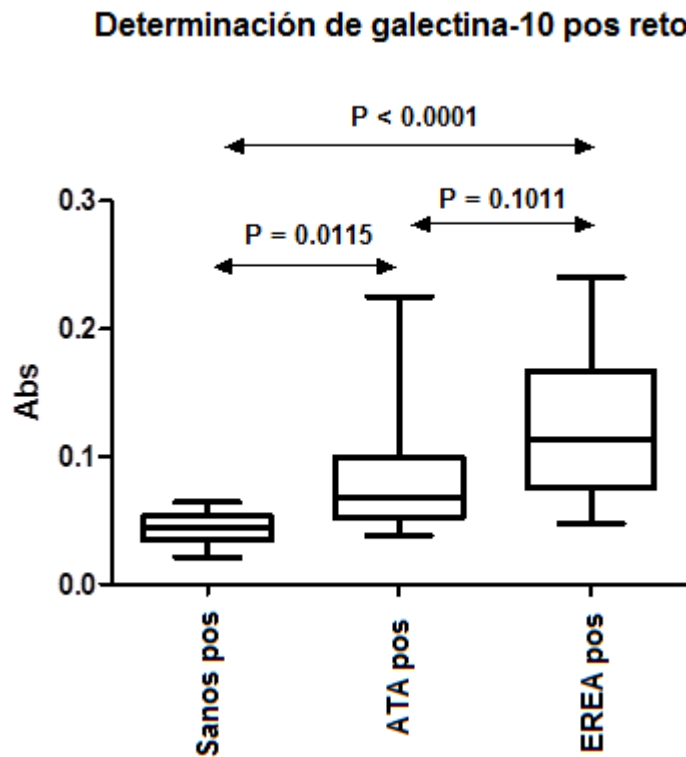


Figura 13. Inmunoreactividad pos reto nasal con lisil-aspirina de galectina-10 en EREA y ATA comparados con los controles sanos.

La inmunoreactividad de galectina-10 posterior al reto nasal entre el grupo de pacientes con EREA y los sanos, resultó ser más evidente (0.114 ± 0.064 vs 0.044 ± 0.014 , $p < 0.0001$), que entre los EREA y los ATA (0.114 ± 0.064 vs 0.068 ± 0.059 , $p > 0.05$).

La diferencia proteica de galectina-10 antes y después del reto nasal con lisil-aspirina en cada uno de los grupos de estudio se muestra en la figura 14.

Determinación de galectina-10 pre y pos reto nasal con lisil-aspirina

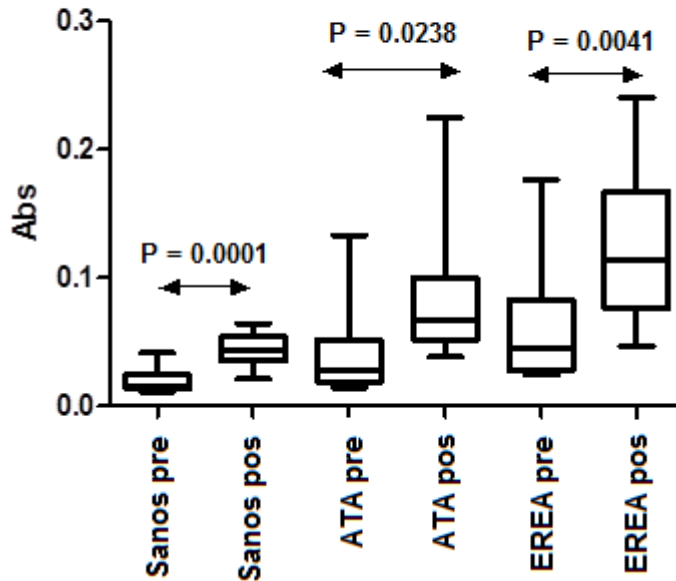


Figura 14. Inmunoreactividad de galectina-10 pre y pos reto nasal en los tres grupos de estudio.

De acuerdo a la figura 14, la inmunoreactividad de galectina-10 se incrementa en los tres grupos de estudio después del reto nasal con lisil-aspirina (EREA: pre 0.045 ± 0.046 vs pos 0.114 ± 0.064 , ATA: pre 0.027 ± 0.039 vs pos 0.068 ± 0.059 y sanos: pre 0.015 ± 0.010 vs pos 0.044 ± 0.014), aunque el grupo de los sanos muestra valores de galectina-10 muy por debajo a los encontrados en los ATA y a los EREA.

Como ya se había mencionado, se observa que tanto en los EREA como en los ATA, hay un incremento significativo de galectina-10 después del reto nasal, (EREA: pre 0.045 ± 0.046 vs pos 0.114 ± 0.064 , $P < 0.005$ y ATA: pre 0.027 ± 0.039 vs pos 0.068 ± 0.059 , $P < 0.05$) siendo mayor éste incremento en el grupo de los EREA. Lo que nos hace suponer que ésta proteína podría estar participando en el proceso asmático que cursan ambos grupos de estudio.

Adicionalmente, se realizó un análisis estadístico comparando la inmunoreactividad de galectina-10 entre el grupo de sanos y la suma de sujetos con ATA y EREA (“grupo de asmáticos”). Nuestros resultados mostraron diferencia estadísticamente significativa tanto en condiciones basales como pos reto (pre: 0.015 ± 0.010 vs 0.042 ± 0.046 , $p < 0.0005$; pos: 0.046 ± 0.016 vs 0.097 ± 0.086 , $p < 0.0001$), lo que apoya nuestra teoría de que galectina-10 está directamente involucrada en el proceso asmático presente en nuestro grupo de estudio.

Al igual que en el análisis anterior la inmunoreactividad de galectina-10 se incrementó en los dos grupos después del reto nasal con lisil-aspirina (Sanos: pre 0.015 ± 0.010 vs pos 0.044 ± 0.014 , $p < 0.0005$; Asmáticos: pre 0.042 ± 0.046 vs 0.097 ± 0.086 , $p < 0.001$).

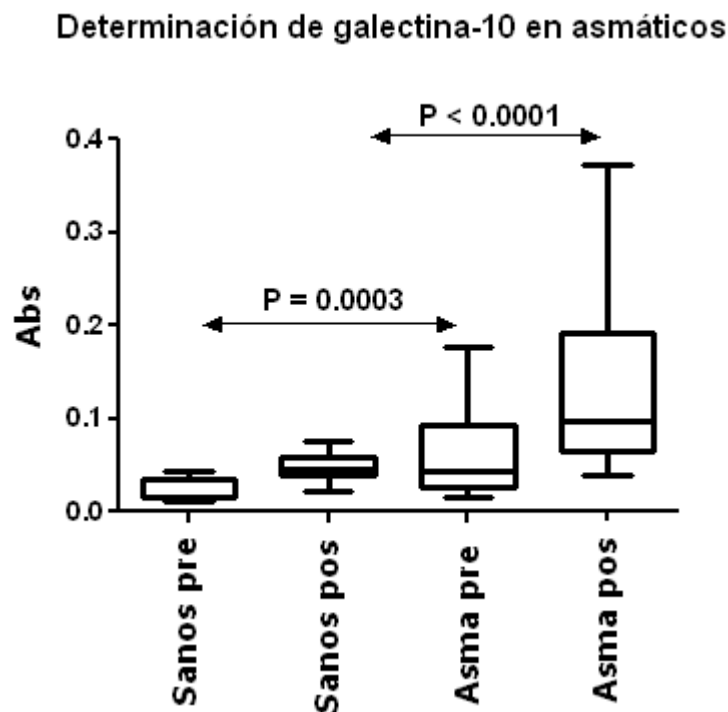


Figura 15. Inmunoreactividad de galectina-10 en el grupo de sujetos sanos y “Asmáticos” (EREA + ATA) pre y pos reto nasal con lisil-aspirina.

7.4 Resultados del Western blot

Esta técnica se empleo para determinar la posible presencia de galectina-10 en pólipos nasales de pacientes con EREA y ATA, y compararlo con su contraparte, mucosa nasal sana.

Como control positivo se utilizo un extracto proteico de eosinófilos (ver fig. 15).

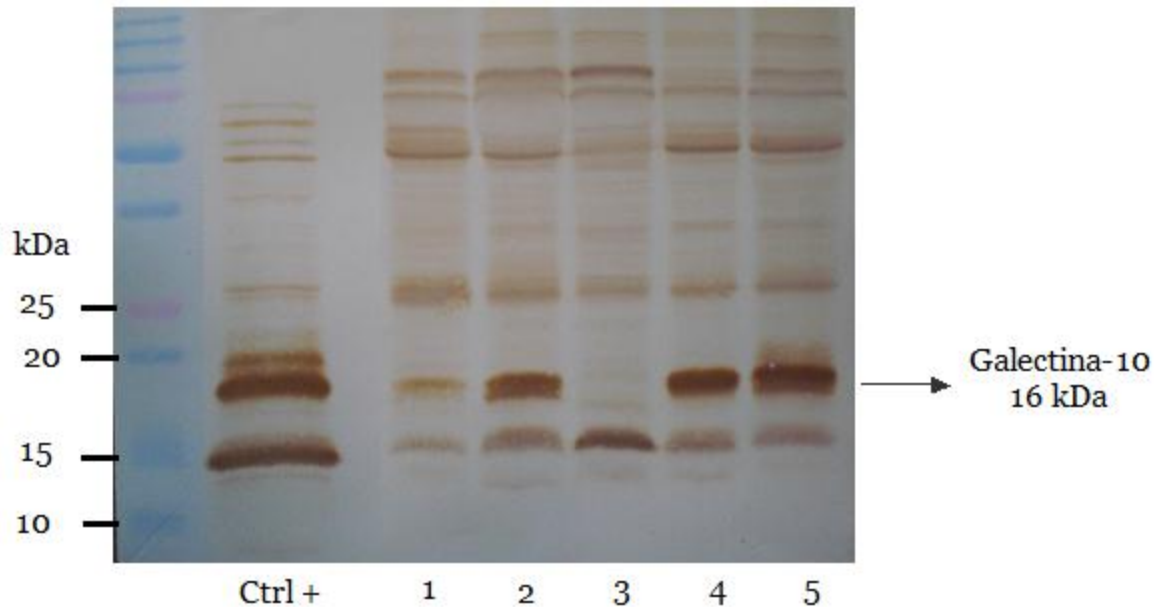


Figura 15. Detección de galectina-10 por Western blot en pólipos y mucosa nasal. Carril 1 (C+), extracto proteico de eosinófilos . Carril 3 , mucosa nasal sana. Carril 1, pólipo nasal de ATA, Carril 2,4 y 5, pólipo nasal de EREA

Como se puede observar en la figura 15, el pólipo nasal de los tres diferentes pacientes con EREA probados, mostraron mayor contenido de galectina-10, en comparación con el pólipo del asmático tolerante a la aspirina. En cuanto al extracto del tejido de la mucosa nasal sana no se observo presencia alguna de galectina-10. Estos resultados nos sugieren que la presencia de galectina-10 en el tejido en estudio puede ser un reflejo indicativo de un alto grado de infiltrado celular, eosinófilos, en el tejido de los pacientes con proceso inflamatorio crónico.

8. Discusión

Estudios recientes han demostrado que algunos miembros de la familia de las galectinas participan activamente en procesos relacionados con la regulación de la respuesta inmune, actuando como mediadores de la inflamación tanto aguda como crónica. Por ejemplo se ha observado que la expresión de la mayoría de las galectinas se modifica primordialmente en respuesta a agentes activadores, infecciosos e inflamatorios (21). Existe información acerca de las propiedades funcionales de algunos miembros de la familia de las galectinas en especial de la galectina-1 y la galectina-3 (8, 38, 39), pero sobre la galectina-10 existe muy poca información. En el año de 1982, Ackerman y cols., mencionaron la posible relación de la galectina-10 en procesos inflamatorios (40) pero no es, sino hasta años recientes que se publicaron trabajos donde directamente se encontró la expresión de galectina-10 en pacientes con rinitis alérgica, enfermedad caracterizada por un marcado proceso de tipo inflamatorio (3, 4); sin embargo en ninguno de estos estudios se le atribuyó alguna función biológica clara, lo que hace que siga siendo motivo de estudio.

La EREA es un padecimiento poco estudiado, la falta de conocimiento de ésta enfermedad ha provocado que estos sujetos sean sub diagnosticados, lo que hace relevante, lograr un diagnóstico certero de los sujetos intolerantes a la aspirina, debido a que la ingesta de ésta les puede provocar desde síntomas leves como congestión nasal, rinorrea, urticaria hasta shock anafiláctico, incluso la muerte. Para diagnosticar correctamente esta enfermedad no sólo bastan los signos y síntomas como son asma, poliposis nasal, sinusitis hipereosinofílica hiperplásica e intolerancia a la aspirina (1); ya que algunos de estos síntomas también son presentados por ATA, por lo cual para brindar un diagnóstico oportuno y certero es esencial la realización de un reto con el agente desencadenante.

El reto nasal con lisil-aspirina realizado por parte del grupo clínico resultó un método de diagnóstico eficaz y seguro, actualmente está siendo usado para el diagnóstico y reclutamiento eficaz de pacientes con EREA en el laboratorio de Inmunoalergia y asma

del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, sin embargo a pesar de contar con una buena sensibilidad, 80% (34), es un método largo (4h), riesgoso e incomodo para el paciente, por lo que sigue siendo trascendente encontrar algún biomarcador para no sólo su diagnóstico sino también para el pronóstico de la enfermedad.

Los datos demográficos que se muestran en la tabla 2 indican que la EREA es un padecimiento que se presenta a partir de la tercera década de vida a diferencia del asma que puede presentarse a edades tempranas. Este padecimiento se presentó en sujetos de edad avanzada pero no en niños o jóvenes en nuestro grupo de estudio, además se observó que afecta más a las mujeres que a los hombres, características que concuerdan con lo reportado en la literatura (1).

Nuestros resultados mostraron que los pacientes con EREA presentaron menor expresión de galectina-10 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) respecto a los sujetos sanos y a los ATA, en contraste con los resultados obtenidos por Devouassoux y cols., (2) quienes reportaron una sobre expresión del gene de galectina-10 en pacientes con EREA comparados con ATA. Nosotros suponemos que existen varias razones por las cuales nuestros resultados mostraron ésta gran diferencia. Para empezar nosotros analizamos la expresión de galectina-10 en la población de CMSP, mientras que Devasoux y cols., (2) lo hicieron en el ARN de muestras de sangre completa. Por otro lado, es bien sabido que los diferentes procedimientos de aislamiento del ARN, pueden mostrar diferentes patrones de expresión génica (41), o más aún también se ha visto que existe diferencia de expresión en el grupo de las galectinas como consecuencia de la edad del grupo de estudio (42).

Aun así, de acuerdo a nuestros resultados podemos pensar que la galectina-10 probablemente está involucrada en la evolución de la EREA.

Como ya se ha mencionado la galectina-10 se encuentra en diversos tejidos, fluidos corporales y en células involucradas en la respuesta alérgica e inflamatoria, como lo son los eosinófilos y los basófilos (43). Además se ha observado que la galectina-10 se

puede encontrar contenida en el tejido de los senos paranasales y en el tejido nasal inflamado (33). Por lo que también fue de nuestro interés analizar por Wester blot, la presencia de galectina-10 en pólipos nasales de pacientes con EREA y con ATA, y compararlo con el extracto tisular proteico de mucosa nasal sana. Interesantemente hubo una marcada sobre-expresión de galectina-10 en el extracto polipoideo proveniente de los EREA, con respecto a los ATA, y no se observó evidencia alguna de la presencia de la proteína en estudio en el extracto proteico del tejido proveniente de los voluntarios sanos. Estos resultados nos sugieren que galectina-10 participa en los procesos inflamatorios de tipo crónico. Adicionalmente, cabe mencionar que las tinción de hematoxilina-eosina de los pólipos estudiados (resultados no se muestran) evidenciaron un alto grado de eosinófilos, lo que en este caso nos sigiere una correlación directa con la presencia de la galectina-10.

Es importante mencionar, que se ha reportado que la galectina-10 o los Cristales de Charcot Leyden (CLC) tienen actividad enzimática de lisolecitin-acilhidrolasa (fosfolipasa), la cual es una de las proteínas involucradas en las funciones inmunes de los eosinófilos (33). Desafortunadamente se ha visto que ésta enzima tiene la habilidad de dañar el epitelio respiratorio por lo que incrementa la permeabilidad vascular (44, 45), lo que nos explicó parcialmente el hallazgo de la proteína galectina-10 en los lavados nasales estudiados.

El daño del epitelio respiratorio asociado al incremento en la permeabilidad vascular, nos sugirió la posible liberación de galectina-10 en el lavado nasal así como también algunas otras moléculas de tipo inflamatorio (46). Por lo que fue de nuestro interés estudiar los niveles de galectina-10 en loslavados nasales justo después de hacerles un reto con el agente desencadenante de la enfermedad, la Lisil-aspirina.

En condiciones basales y después del reto con la lisil-aspirina, los resultados evidenciaron concentraciones mayores de galectina-10 en los lavados nasales de los pacientes con EREA, comparados con los ATA y los voluntarios sanos. Sin embargo es

importante destacar que no se encontró diferencia significativa en la expresión proteica entre los EREA y los ATA.

Estos resultados nos hacen suponer que esta proteína podría estar participando en el proceso asmático que presentan ambos grupos de estudio, lo cual se reafirmó con el análisis adicional realizado entre el grupo de sujetos sanos y el grupo asmático (EREA + ATA), ya que se encontró diferencia significativa entre sanos y asmáticos tanto en condiciones basales como pos reto nasal.

Relacionando los resultados obtenidos de la expresión de galectina-10 en CMSP y los obtenidos en condiciones basales en los lavados nasales, se observa que no hay una correlación directa. Esta discrepancia se puede deber a que las CMSP solo nos representa lo que ocurre a nivel sistémico, y los resultados obtenidos en el lavado nasal, es el reflejo de lo que sucede a nivel local. Lo que nos hace pensar que puede existir una gran cantidad de eosinófilos que son reclutados al lugar de inflamación y liberan esta proteína como consecuencia de su activación, a pesar de que a la fecha no se ha sostenido que la EREA sea un padecimiento que conlleve una respuesta de tipo alérgico.

Adicionalmente de acuerdo a los resultados, podemos asumir que la galectina-10 se encuentra involucrada directamente en los procesos asmáticos de tipo inflamatorio, ya sean crónicos o agudos, dado a que dicha proteína se encuentra exacerbada tanto en los pacientes ATA como en los EREA, aunque más marcado en éstos últimos, antes y después del reto.

Todos los hallazgos mencionados en nuestro trabajo nos sugieren la posibilidad de que galectina-10 pueda tener un papel muy importante en la exacerbación de la respuesta inflamatoria, y podría utilizarse como un posible marcador en el correcto diagnóstico de la EREA. Sin embargo, se requieren más estudios para determinar su función biológica específica.

9. Conclusiones

Este es el primer estudio donde se reporta la liberación de galectina-10 en pacientes con EREA y con ATA en lavados nasales, por lo que de acuerdo con nuestros resultados se sugiere la participación de dicha proteína en la patogénesis y exacerbación de ésta enfermedad, sin embargo se requieren más estudios para determinar su función biológica específica.

Por otro lado creemos que necesitamos realizar más estudios para llegar a usar la galectina-10 como un biomarcador diagnóstico y pronóstico de la EREA.

No se encontró correlación directa entre la expresión génica en CMSP y la inmunoreactividad de galectina-10 en lavados nasales.

10. Bibliografía

1. Stevenson DD, Szczeklik A. Clinical and pathologic perspectives on aspirin sensitivity and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 118: 773-786.
2. Devouassoux G, Pachot A, Laforest L, Diasparra J, Freymond N, Van Ganse E, Mougin B, Pacheco Y. Galectin-10 mRNA is overexpressed in peripheral blood of aspirin-induced asthma. *Allergy.* 2008; 63(1): 125-131.
3. Ghafouri B, Irander K, Lindbom J, Tagesson C, Lindahl M. Comparative proteomics of nasal fluid in seasonal allergic rhinitis. *J Proteome Res.* 2006; 5: 330-338.
4. Benson M, Langston MA, Adner M, et al. A network-based analysis of the late-phase reaction of the skin. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 118 (1): 220-225.
5. Farooque S, Lee T. Aspirin-sensitive respiratory disease. *Annu. Rev. Physiol.* 2009; 71:465–487.
6. Szczeklik A, Stevenson DD. Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis and management. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 1: 5 – 13.
7. Babu KS, Salvi SS. Aspirin and asthma. *Chest.* 2000;118(5):1470-1476.
8. Ortiz QB. Galectina-1: regulador negativo de la respuesta inmune inflamatoria y posible agente terapéutico. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2009; 22 (3): 206-216.
9. Palikhe NS, Kim J, Park H. Update on recent advances in the management of aspirin exacerbated respiratory disease. *Yonsei Med J.* 2009; 50(6): 744-750.

10. Casadevall J, Ventura PJ, Mullol J, Picado C. Intranasal challenge with aspirin in the diagnosis of aspirin intolerant asthma: evaluation of nasal response by acoustic rhinometry. *Thorax*. 2000; 55: 921 – 924.
11. Venge. What is the role of the eosinophil?. *Thorax*. 1990; 45: 161-163.
12. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, et al. Eosinophils: Biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38: 709–750.
13. Brito GF, Yamazaki MA, Espinosa PS, Vázquez TO, et al. Eosinófilos: Revisión de la literatura. *Alerg, Asm Inmunol Pediatr*. 2003; 12 (2): 56-62.
14. Valdivia Blondet Luis. Los eosinófilos y la piel. *Dermatol Peru*. 2007; 17 (2): 83-94.
15. Ackerman SJ, Corrette SE, Rosenberg HF, Bennett JC, Mastrianni DM, Nicholson-Weller A, Weller PF, Chin DT, Tenen DG. Molecular cloning and characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase). Similarities to IgE binding proteins and the S-type animal lectin superfamily. *J Immunol*. 1993; 150(2): 456-68.
16. Rabinovich GA, Rubinstein N. Galectinas: Una nueva familia de proteínas involucradas en la regulación de la respuesta inmune. *MEDICINA*. 2001; 61: 85-92.
17. Rabinovich GA. Galectins: An evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Differ*. 1999; 6: 711–721.

18. Liu Fu-Tong. Regulatory roles of galectins in the immune response. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005;136: 385–400.
19. Rubinstein N, Ilarregui JM, Toscano MA, Rabinovich GA. The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. *Tissue Antigens.* 2004; 64: 1–12.
20. Martí Ilarregui Juan. “Papel crítico de galectina-1 en la diferenciación de células dendríticas tolerogénicas: relevancia fisiopatológica *in vivo* en la interfase de inflamación crónica y cáncer”. Director: Gabriel A. Rabinovich. Tesis de doctorado. Universidad de Buenos Aires, Facultad de ciencias exactas y naturales, Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular. 2009.
21. Rapoport EM, Kurmyshkina OV, Bovin NV. Mammalian galectins: Structure, carbohydrate specificity, and functions. *Biochemistry.* 2008; 73(4): 393-405.
22. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1572: 263-273.
23. Rabinovich GA, Rubinstein N, Toscano MA. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1572:274-284.
24. Dvorak AM, Letourneau L, Login GR, Weller PF, Ackerman SJ. Ultrastructural localization of the Charcot-Leyden crystal protein (Lysophospholipase) to a distinct crystalloid-free granule population in mature human eosinophils. *Blood.* 1988; 72: 150-158.
25. Ackerman SJ, Liu L, Kwatia MA, Savage MP, Leonidas DD, Swaminathan GJ et al. Charcot-Leyden crystal protein (galectina 10) is not a dual function galectin with lysophospholipase activate but binds a lysophospholipase inhibitor in a novel structural fashion. *J Biol Chem.* 2002; 277: 14859-14868.

26. Leonidas DD, Elbert BL, Zhou Z, Leffler H, et al. Crystal structure of human Charcot-Leyden crystal protein, an eosinophil lysophospholipase, identifies it as a new member of the carbohydrate-binding family of galectins. *Structure*. 1995; 3: 1379-1393.
27. Gomolin HI, Yamaguchi Y, Paulpillai AV, Dvorak LA, et al. Human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein: Cloning and characterization of a lysophospholipase gene promoter. *Blood*. 1993; 82: 1868-1874.
28. Kubach J, Lutter P, Bopp T, Stoll S, Becker C, Huter E, et al. Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood*. 2007; 110: 1550–1558.
29. Bryborn M, Halldén C, Säll T, Cardell LO. CLC – a novel susceptibility gene for allergic rhinitis?. *Allergy*. 2010; 65: 220–228.
30. Plager DA, Kahl JC, Asmann YW, Nilson AE, et al. Gene transcription changes in asthmatic chronic rhinosinusitis with nasal polyps and comparison to those in atopic dermatitis. *Plos one*. 2010; 5: 1-9.
31. De Re V, Simula MP, Cannizzaro R, Pavan A, et al. Galectin-10, eosinophils, and celiac disease. *Ann NY Acad Sci*. 2009; 1173: 357-364.
32. Gleich GJ, Loegering DA, Mann KG, Maldonado JE. Comparative properties of the Charcot-Leyden crystal protein and the major basic protein from human eosinophils. *J Clin Invest*. 1976; 57: 633-640.

33. Pantanowitz L, Balogh K. Charcot-Leyden crystals: pathology and diagnostic utility. *Ear Nose Throat J.* 2004; 83: 489-490.
34. Nizankowska-Mogilnicka E, Bochenek G, Mastalerz L, Swierczynska M, et al. EAACI/GA2LEN guideline: Aspirin provocation tests for diagnosis of aspirin hypersensitivity. *Allergy.* 2007; 62: 1111–1118.
35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
36. Laemmli V. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
37. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols.* 2008; 3: 1101 – 1108.
38. Sano H, Hsu K, Yu L, Apgar JR, et al. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocyte and macrophages. *J Immunol.* 2000; 165: 2156-2164.
39. Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, et al. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol.* 2000; 156: 899-909.
40. Ackerman SJ, Weil GJ, Gleich GJ. Formation of Charcot-Leyden crystals by human basophils. *J Exp Med.* 1982; 155: 1597-609.
41. Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, Wyrich R, et al. Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin Chem.* 2002; 48: 1883-1890.

42. Dias-Baruffi M, Stowell SR, Song SC, Arthur CM, et al. Differential expression of immunomodulatory galectin-1 in peripheral leukocytes and adult tissues and its cytosolic organization in striated muscle. *Glycobiology*. 2010; 20: 507-520.
43. Ackerman SJ, Swaminathan GJ, Leonidas DD, Savage MP, et al. Structural biology of Charcot–Leyden crystal protein (Galectin-10): new insights into an old protein. *Respiratory Medicine*. 2000; 94: 1014-1016.
44. Harlin SL, Ansel DG, Lane SR, Myers J, et al. A clinical and pathologic study of chronic sinusitis: the role of the eosinophil. *J Allergy Clin Immunol*. 1988; 81: 867-875.
45. Huang F, Subbaiah PV, Holian O, Zhang J, et al. Lysophosphatidylcholine increases endothelial permeability: role of PKC α and RhoA cross talk. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005; 289: L176-185.
46. Perić A, Vojvodić D, Radulović V, Vukomanović-Durdević B, et al. Proinflammatory cytokine levels in nasal fluid as indicators of severity of nasal polyposis. *Acta Clin Croat*. 2010; 49: 395-403.

11. Apéndice

- **PBS (Solución amortiguadora de fosfatos)**

Se pesaron 8g de cloruro de sodio (NaCl) (J.T. Baker), 0.2g de cloruro de potasio (KCl) (J.T. Baker), 1.44g de fosfato monoácido de sodio (Na_2HPO_4) (MERCK) y 0.24g de fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4) (J.T. Baker) y se disolvieron en un litro de agua desionizada. El pH se ajustó a 7.4.

- **H₂O DEPC**

Se adicionó 1mL de dietilpirocarbonato (DEPC) (Amresco) a un litro de agua desionizada, se agitó vigorosamente por 1 hora y se incubó durante 12 horas a 37° C.

- **Etanol al 75% en H₂O DEPC**

Se adicionaron 25mL de H₂O DEPC a 75mL de etanol absoluto (J.T. Baker) y se mezcló.

- **Solución de lisis**

Se pesaron 2.42g de Tris (Sigma), 0.038g de EDTA (Sigma), 0.87g de cloruro de sodio (NaCl) (J.T. Baker) y 0.21g de Fluoruro de sodio (NaF) (Sigma) y se disolvieron en 100mL de agua desionizada. Se mezcló y el pH se ajustó a 7.5. Se adicionó 1% de Triton X-100 () al momento de usar el buffer de lisis.

- **Solución amortiguadora para electroforesis**

Se pesaron 3.03g de Tris (Sigma), 14.4g de glicina (Sigma) y 1g de dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma) y se aforo a 1 litro con agua desionizada. El pH se ajustó a 8.3.

- **Solución amortiguadora para transferencia**

Se pesaron 3.03g de Tris (Sigma), 14.4g de glicina (Sigma), se adicionaron 100mL de metanol (J.T. Baker) y se aforo a 1 litro con agua desionizada. El pH se ajustó a 8.3.

- **Solución de lavado para Western blot**

Se adiciono 1mL de Tween-20 (Sigma) a 1 litro de PBS y se mezcló.

- **Solución bloqueadora para Western blot**

Se pesaron 3g de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) y se disolvió en 100mL de solución de lavado, se agitó y se filtró con filtros Millex de 0.45 μ m (Millipore).

- **Solución de lavado para ELISA**

Se adicionaron 0.5mL de Tween-20 (Sigma) a 1 litro de PBS y se mezcló.

- **Solución bloqueadora para ELISA**

Se pesó 1g de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) y se disolvió en 100mL de solución de lavado, se agitó y se filtró con filtros Millex de 0.45 μ m (Millipore).