

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
ISMAEL COSIO VILLEGAS

**DETECCIÓN DE α -DEFENSINAS A NIVEL NASAL EN LA
INFECCIÓN RESPIRATORIA VIRAL AGUDA**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**SUB ESPECIALISTA EN
ALERGOLOGÍA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA**

P R E S E N T A

MAGDALENA MOLINA MACIP

TUTORES DE TESIS:

DR. LUIS MANUEL TERAN JUÁREZ

DR. FERNANDO RAMÍREZ JIMÉNEZ

MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2014



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.

Esta tesis fue realizada en:

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, “Ismael Cosío Villegas” (INER).

Investigadores asociados:

Maestra en ciencias Aurea Rosalía Montes Vizuet, Departamento de investigación en inmunogenética del INER

Tec. En Lab. Cesar Rentería Rosales, Auxiliar de bioterio A

A mis padres, la luz de bendiciones que guía mi camino

*En especial a mi Mamá, por su apoyo incondicional para cumplir
mis sueños y objetivos*

A mi hermana deseando que todos sus sueños se cumplan

A todos mis compañeros y amigos con cariño

Recíbe un trébol de la suerte

En tu noble misión...

Habilidad y firmeza

Como un sol muy fuerte

Díos os da perfección

Conduce tu destreza

y bendice tu corazón.

Índice	Página
I. Resumen	8
II. Marco Teórico	9
III. α -Defensinas	11
Mecanismo antiviral de α -defensinas	15
Inhibición de la replicación virus de influenza por medio de α -defensinas	16
Mecanismo de neutralización de adenovirus por medio de α -defensinas	19
Concentraciones fisiológicas de α -defensinas	22
IV. Planteamiento del problema	24
V. Justificación	25
VI. Hipótesis	26
VII. Objetivos	27
VIII. Materiales y métodos	28
IX. Resultados	31
X. Discusión	38
XI. Conclusiones	42
XII. Bibliografía	43
XIII. Anexos	48

Índice de figuras y tablas	Página
Tabla 1 Principales características de catelicidinas y defensinas	10
Figura 1 Enlaces disulfuro intramoleculares de α -defensinas	11
Figura 2 α -defensinas humanas, residuos de aminoácidos	13
Figura 3 Mecanismo antiviral de α -defensinas	15
Figura 7 Inhibición de la replicación virus de influenza por medio de α -defensinas	17
Figura 8 Efecto de las α -defensinas dependiente del tiempo, sobre la replicación del virus de influenza	18
Figura 9 Inhibición de infección de Adenovirus por medio de α -defensinas humanas	21
Figura 10 Inhibición temprana de infección por adenovirus	21
Figura 4 Dilución para realizar ELISA α -defensinas	63
Figura 5 ELISA α -defensinas	64
Figura 6 ELISA α -defensinas solución STOP	65
Tabla 2 . Características demográficas y de la enfermedad en la población de estudio	31
Grafica 1 Frecuencia y proporción de características clínicas.	32
Grafica 2 Presencia de α -defensinas tipo 1 y 3.	33
Grafica 3. Niveles de α -defensinas tipo 1 y tipo 3 y su asociación con el diagnóstico de infección viral	34
Grafica 4. Descenso de los niveles de α -defensina tipo 3 post-infección.	35
Grafica 5. Descenso de los niveles de α -defensinas tipo 3 en la resolución de la infección por Influenza A (A) y Adenovirus (B).	36
Grafica 6. α -defensinas tipo 3 y su asociación con la presencia de tos seca y productiva.	37

I. Resumen

Antecedentes: Durante la infección respiratoria viral hay reclutamiento celular en la vía aérea, en especial de neutrófilos, y hasta el momento no se cuenta con tratamiento para erradicar los virus respiratorios. Los neutrófilos desempeñan un papel trascendente en el control de las enfermedades infecciosas a través de mecanismos propios a la inmunidad innata, en los que se incluyen la acción de un tipo de péptidos antimicrobianos llamados defensinas. Las α -defensinas o péptidos de neutrófilos humanos (HNP) tipo 1, 3 y 4, tienen actividad antimicrobiana mediante la inducción de síntesis de mucina, quimiocinas y citoquinas. Las defensinas pueden inhibir la replicación viral, los mecanismos para este fin son la disrupción de señales intracelulares, así como la neutralización de la fusión viral por acción directa sobre glucoproteínas y cápsides y la modulación de receptores de las células epiteliales. Aunado a lo anterior, las defensinas pueden funcionar como quimiocinas que incrementan la respuesta adaptativa inmune, resultando en un mecanismo antiviral indirecto. Se ha documentado la detección de HNP-1 *in vitro* en infección por Influenza A. Se desconoce si existe la presencia de α -Defensinas en el tracto respiratorio superior y si su síntesis tiene relación con infecciones virales específicas. Hasta el momento se desconoce la participación de las α -defensinas en el tracto respiratorio superior durante la infección viral aguda. **Hipótesis:** La infección viral aguda induce la síntesis de α -defensinas en el tracto respiratorio superior como parte de los mecanismos involucrados en la respuesta inmune innata. **Objetivo General:** Conocer si existe síntesis de α -defensinas HNP 1 y 3 en la infección viral aguda del tracto respiratorio superior en pacientes escolares. **Objetivos Particulares:** Asociar la presencia de α -defensinas HNP 1, y 3 con el agente etiológico viral detectado en la secreción nasal de los pacientes con infección del tracto respiratorio alto. Comparar los niveles de α -defensinas HNP 1, y 3 durante y posterior a la resolución de la infección vírica. Describir los niveles en la infección por un solo agente etiológico viral en comparación a la infección viral. **Métodos:** Mediante un estudio transversal se analizaron los valores de HNP 1 y 3 a nivel nasal durante un proceso infeccioso viral; se incluyó un grupo de pacientes escolares que presentaron cuadro clínico de infección respiratoria alta y que ésta fuera sugerente de etiología viral. Se obtuvo una muestra de secreción nasal y se realizó Inmunofluorescencia para detección de agentes virales, en caso de ser positiva se cuantificaron los niveles de α -defensina por medio de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Se elaboró registro de signos y síntomas respiratorios de los niños participantes en el estudio, para la fenotipificación específica de acuerdo al virus. Se elaboró- linmunofluorescencia para los siguientes virus: *Influenza A*, e *Influenza B*; *Parainfluenza 1, 2, 3*, *Virus sincitial respiratorio (VSR)*, se obtuvieron 100 muestras positivas para infección viral, de las cuales se eligieron exclusivamente las positivas para Influenza A, Adenovirus y VSR. Las α defensinas HNP1, y HNP3 se identificaron en el sobrenadante de las muestras mediante un ELISA. **Resultados:** Se analizaron un total de 80 muestras obtenidas de 55 niños, con síntomas de infección respiratoria viral corroborada por inmunofluorescencia. En 25 niños con infección por influenza A o adenovirus, se tomaron muestras de lavado nasal tres semanas posteriores a la remisión del proceso infeccioso y se corroboró negatividad por medio de inmunofluorescencia. No hubo diferencia significativa en la proporción de pacientes con niveles detectables de HNP 1 y 3 con infección viral o sin ella. Sin embargo existió diferencia en los niveles de HNP 3 asociándolo al tipo de infección o ausencia de ésta. También se corroboró un descenso en los niveles de HNP-3 al tener resolución el proceso infeccioso, principalmente en la infección por Adenovirus. La única asociación encontrada con el cuadro clínico y los niveles de HNP, fue la presencia de tos productiva y su asociación directamente proporcional con los niveles de α -defensinas tipo 3. **Conclusiones:** Hubo niveles detectables tanto de HNP-1 como de HNP-3 tanto en los procesos infecciosos virales como en los controles sanos, sin diferencia significativa en cuanto a la proporción de los sujetos; sin embargo los niveles cuantitativos de HNP-3 son significativamente mayores de acuerdo al tipo de infección viral, específicamente Adenovirus e Influenza A y estos niveles sufren reducción cuando hay resolución del proceso infeccioso.

II.MARCO TEORICO

El sistema inmune de los organismos multicelulares tiene un amplio arsenal para proteger al huésped de los constantes ataques de los microorganismos infecciosos.²

En respuesta a la exposición a agentes infecciosos, los leucocitos, en especial los neutrófilos, actúan como primera línea de defensa del huésped. Los gránulos de neutrófilos contienen varios componentes antibacterianos tales como: lactoferrina, lipocalina, lisozima, mieloperoxidasa y pequeños péptidos antimicrobianos como catelicidinas, defensinas α y β , que contribuyen a la destrucción no oxidativa de microorganismos.¹

Los péptidos antimicrobianos son pequeños péptidos catiónicos que participan en los mecanismos de defensa en una gran variedad de organismos vivos, son producidos en bacterias, insectos, plantas e invertebrados con la finalidad de protegerlos ante agentes infecciosos. Estos péptidos también son producidos en mamíferos y se ha demostrado su acción ante bacterias, virus, hongos y ciertos parásitos. Recientemente, se han documentado nuevos efectos biológicos de los péptidos antimicrobianos tales como la neutralización de endotoxinas, actividad quimiotáctica e inmunomoduladora, inducción de angiogénesis y cicatrización de heridas.^{2,3}

La clasificación de los péptidos antimicrobianos es difícil debido a su amplia diversidad, ésta puede fundamentarse en el tipo de aminoácidos que los componen, en su estructura, tamaño y conformación. En el humano se han

descrito los siguientes péptidos antimicrobianos: β -defensinas, α -defensinas, y catelicidinas.²

Tabla 1. Principales características de catelicidinas y defensinas				
Péptido antimicrobiano	Fuente	Regulación e inducción de estímulos	Actividad microbiana	Efectos pleiotropicos
α -Helical LL-37	Células epiteliales intestinales; tracto urinario, tracto respiratorio, piel. Leucocitos: neutrofilos, monocitos, células mieloides	Inducidos por queratinocitos, monocitos, neutrófilos, lipopolisacáridos, ácido butírico (colonocitos)	Actividad de amplio espectro. Especialmente activo contra shigella, A y B, Streptococcus, staphylococcus aureus, Escherichia coli	Inducción de agentes quimiotácticos, reducción de transcripción de moléculas proinflamatorias. Actividad quimiotáctica directa. Angiogénesis
Rico en cisteínas α -defensinas HNP-1,2,3,4	Se encuentra en neutrófilos, (granulos azurófilos)	Expresan constitutivamente	Actividad de amplio espectro contra Gram (+), Gram (-), actividad antiviral (adenovirus)	HNP 1-3 incremento de la expresión de TNF e IL-1 en monocitos. Actividad quimiotáctica
HD-5,6 (Cryptidinas)	Células de Paneth y células del tracto genitourinario femenino	Expresado constitutivamente productos bacterianos (dipeptido de muramilo)	Escherichia coli, salmonella typhimurium	Desconocido
β -defensinas HBD-1	Pulmón y epitelio de vías urinarias	Expresan constitutivamente	Actividad de amplio espectro	Actividad quimiotáctica. Producción de citocinas
HBD-2	Piel, pulmón, intestino, tracto genitourinario	Expresión inducible por IL-1 α , IL-1 β , Gram (+), Gram (-), TNF, candida albicans, lipopolisacaridos	Actividad de amplio espectro. Pseudomonas aeruginosa, E. coli, C. albicans, M. tuberculosis	Actividad quimiotáctica. Producción de citocinas

HBD-3	Superficie epitelial, alta concentración en saliva y vagina	Expresion inducible	Actividad de amplio espectro. S. aureus, Pityrosporum ovale, VIH	La expresion de citoquinas y quimioquinas en mayor medida que los observados en HBD.1,2,4
HBD-4	Testículos, útero y estomago	Expresión inducible	Actividad de amplio espectro	Actividad quimiotáctica

Eduardo Guaní- Guerra, Teresa Santos- Mendoza, Saúl O. Lugo-Reyes, Luis M. Terán. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease, Clin Immunol. 2010 Apr;135(1):1-11.²

II. α -defensinas

Las α -defensinas son pequeños péptidos catiónicos, multifuncionales, las cuales contienen seis cisteínas y tres puentes disulfuro intramoleculares que sirven para estabilizar su estructura, conforme fueron descubiertas y dependiendo el sitio, se clasificaron en subfamilias. Cada subfamilia incluye seis cisteínas con presencia de tres enlaces disulfuro intramoleculares con un patrón característico 1-6, 2-4, 3-5. Estos péptidos catiónicos tienen un peso molecular que va desde 3 a 5 kDa.

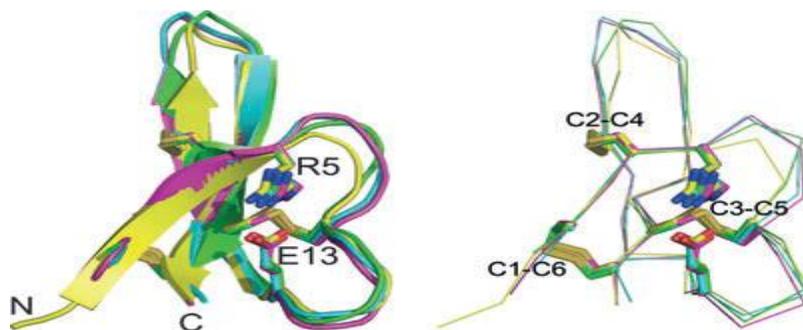


Figura 1: Enlaces disulfuro intramoleculares de α -defensinas

Originalmente, las primeras defensinas humanas alfa eran conocidas como antibióticos peptídicos naturales en los neutrófilos. Cuatro de ellos se expresan en gránulos de neutrófilos y son también conocidos como péptidos de neutrófilos

humanos (HNP-1, HNP-2, HNP-3, HNP-4), son secuestradas en gránulos intracelulares y se liberan cuando los polimorfonucleares son activados. Las defensinas humanas 5 y 6 (HD5 y HD6) se encuentran expresadas en células de Paneth en el intestino delgado y en las células epiteliales del tracto urogenital femenino. Estos péptidos antimicrobianos también existen en las plantas, hongos, micobacterias e invertebrados.^{3,4,6,7}

Los péptidos de neutrófilos humanos son péptidos catiónicos de aminoácidos que contienen seis cisteínas que forman tres enlaces disulfuro intermoleculares catiónicos. Las secuencias de aminoácidos son casi idénticas (XC1YC2RIPAC3IAGERRYGTC4IYQGRLWAF5C6) y solo difieren en la X Alanina, que está presente en HNP-1, ausente en HNP-2 y en HNP-3 se cambia por ácido aspártico. Estudios in vitro han reportado que aproximadamente 10^6 polimorfonucleares contienen 4-5 μg de HNP-1 a HNP-3. Los genes que codifican a HNP-1 a HNP-3 están dispuestos en tándem con un patrón aleatorio que se repite en el cromosoma 8p23.1.^{3,8}

La estructura de las α -defensinas comprende de una matriz de disulfuro, un puente de Na formado por enlaces de hidrogeno Arg 5 Glu 15, Gly (residuo conservado en la posición 17), y la relación molar alta Arg:Lys. Los enlaces disulfuro protegen a las α -defensinas de ser degradadas, el residuo conservado en la posición 17 (Gly) facilitan la interacción eficiente entre péptidos, producen protección contra proteólisis y eventos mediados por receptores, y tienen una secuencia Gly-Xaa. La relación molar alta Arg:Lys se ha observado en ensayos in vitro de péptidos bactericidas en presencia de NaCl, y varios estudios mostraron

Los neutrófilos desempeñan un papel patológico en enfermedades pulmonares a través de α -defensinas, así como elastasa de neutrófilos. Las α -defensinas tienen actividad antimicrobiana principalmente los HPN-1,2,3 y 4, también tienen la capacidad de inducir la síntesis de mucina y quimiocinas/citoquinas incluyendo IL-8, IL-1 β , proteína 1 quimiotáctica de monocitos, y proteína activadora de neutrófilos por medio de las células epiteliales del pulmón, colágeno tipo I, heat shock protein 47 (HSP47) producida por fibroblastos del pulmón. Voglis et al. demostraron que altas concentraciones de los α -defensinas inducen un defecto antimicrobiano en la función de neutrófilos, estos reportes sugieren que las α -defensinas son capaces de modular la respuesta inflamatoria y que la IL-8 (factor quimiotáctico de neutrófilos) juega un papel muy importante en la inflamación de los pulmones inducida por las α -defensinas. Las α -defensinas también mejoran la interacción entre las células epiteliales del pulmón y linfocitos CD4+ mediante el aumento de la adhesión celular y la liberación de IL-8, lo que indica que los péptidos neutrófilos humanos enlazan la respuesta innata y adaptativa. ¹⁰

La diversidad de la sensibilidad de las defensinas hacia diferentes especies de virus, refleja una multitud de mecanismos antivirales. Estos mecanismos incluyen la acción directa sobre las envolturas, glicoproteínas y capsides virales en suma a la inhibición de la fusión viral y la neutralización post-entrada. La modulación de los receptores de las células del huésped y la interrupción de señales intracelulares por α -defensinas también pueden inhibir la replicación viral. Aunado a lo anterior, las α -defensinas pueden funcionar como quimiocinas que incrementaría la

respuesta adaptativa inmune, resultando en un mecanismo antiviral indirecto.¹¹ Se ha documentado la detección de HNP-1 in vitro en infección por Influenza A.³

III. Mecanismo antiviral de α -defensinas

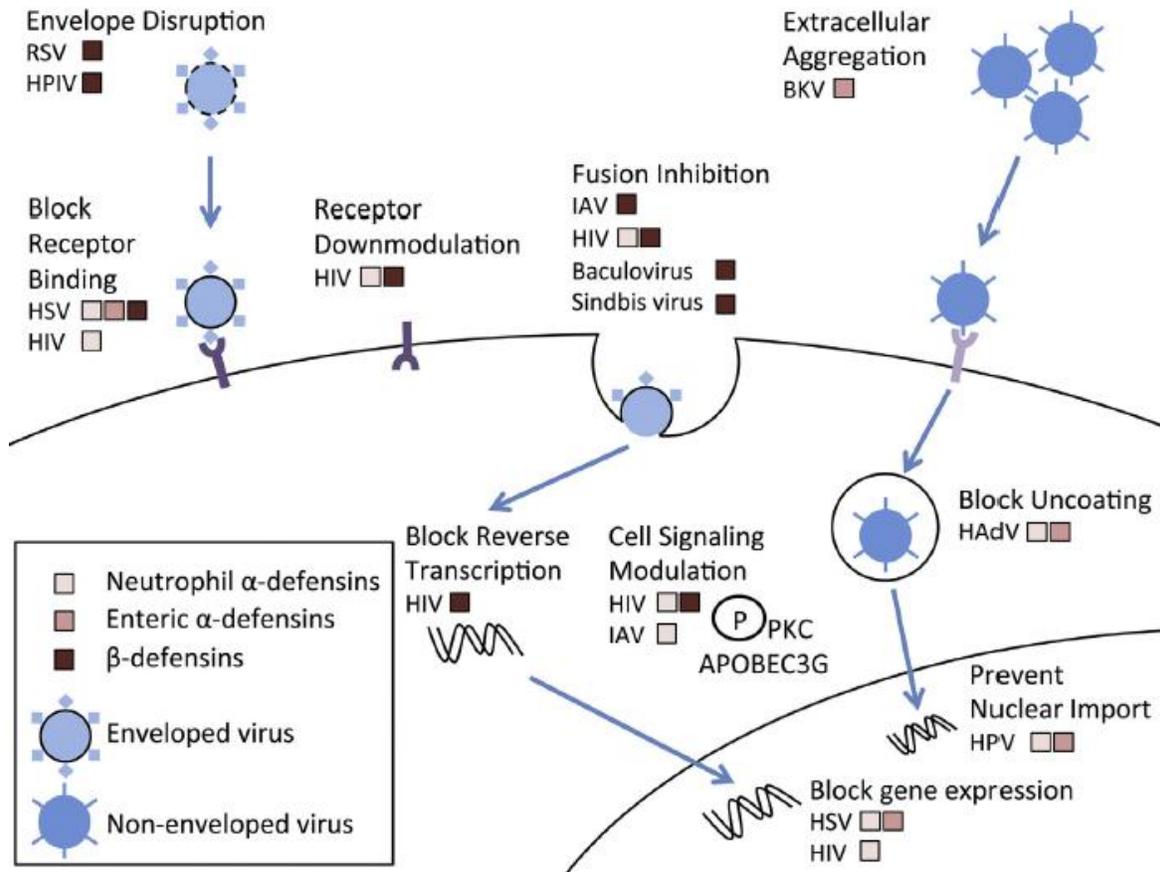


Figura 3. Los principales mecanismos antivirales de defensinas, su impacto es sobre la entrada del virus, su capacidad para neutralizar diferentes virus, un ejemplo en el virus de herpes simple tipo 1, VIH-1, influenza A y adenovirus¹¹.

El mecanismo antiviral directo entre defensinas y virus se ha determinado que interactúa con las bicapas de lípidos, lo que se facilita por la presencia de fosfolípidos cargados negativamente; en segundo lugar las α -defensinas 1-3 y la

defensina humana 5 se ha identificado que son lectinas capaces de unirse a glicoproteínas y glicolípidos; en tercer lugar, las defensinas pueden potenciar las interacciones entre proteína-proteína y proteína-DNA. Todo este mecanismo es debido a que son péptidos catiónicos, anfipáticos, y que interactúan con ligandos a través de carga-carga y otras interacciones hidrofóbicas. Cada una de estas interacciones contribuye a la actividad antiviral de las defensinas, la importancia relativa depende del virus específico, y aún se encuentra en investigación.¹¹ Estudios han reportado que las α -defensinas son capaces de inhibir al virus herpes simple 1, adenovirus humano serotipo 5, influenza A, VIH-1.¹¹

La afinidad relativa para objetivos específicos o dianas virales puede explicar porque algunas defensinas tienen actividad antiviral específica. Se ha demostrado que la defensina humana 5 se une a glicoproteínas virales naturales en particular para el virus de herpes simple tipo 1, la glicoproteína D, y para el VIH-1 se une a la glucoproteína 120.¹¹

Inhibición de la replicación virus de influenza por medio de α -defensinas

El virus de influenza A sigue siendo una amenaza importante para la salud humana, con un promedio de 36 000 muertes atribuida a influenza cada año en Estado Unidos.⁴¹

Se ha estudiado in vitro la actividad antiviral de las α -defensinas tipo 1 (HNP-1), contra el virus de influenza.⁴¹ Además de las epidemias anuales, la perspectiva de una nueva pandemia se ha destacado por circular la cepa patógena aviar H5N1 entre las especies de aves domésticas y silvestres.⁴¹

Se han realizado varios estudios en donde se observa inhibición de la replicación del virus de la influenza en líneas celulares de riñón de bovino, en las cuales se añadió α -defensinas tipo 1, (HNP-1 20mg/ml) durante 18 hrs, los datos que se obtuvieron con una desviación estándar de la media de 3 experimentos diferentes, fueron los siguientes: se reportó $*P<0.0001$ para células infectadas no tratadas vs células pretratadas con HNP-1 y para células no tratadas infectadas frente a células tratadas con HNP-1 después de la infección (Student's *t* test). No hubo diferencia estadística entre las dos líneas celulares tratadas previamente con HNP-1.⁴¹ (Figura 7)

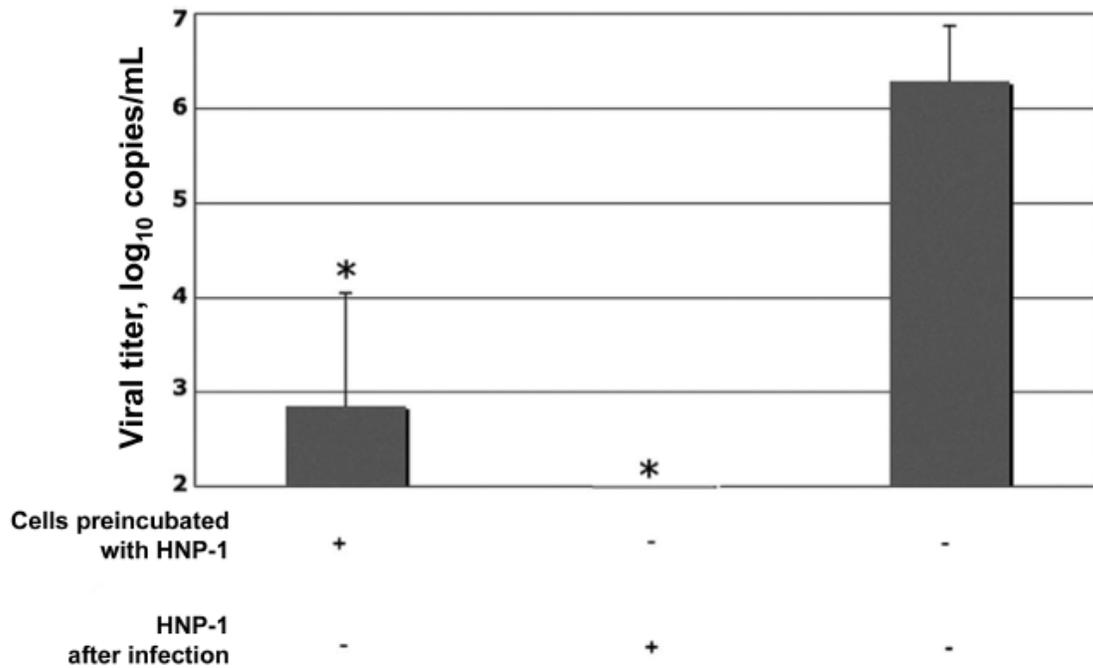


Figura 7. **Inhibición de la replicación virus de influenza por medio de α -defensinas**, Esta figura muestra en la columna 1 el momento en que las células fueron tratada o incubadas con HNP-1 previo a la infección, dando como resultado una inhibición sostenida de la replicación viral de influenza, se produjo una inhibición similar cuando se añadió HNP-1 inmediatamente después de la infección (columna 2).⁴¹

El mecanismo por el cual las α -defensinas tipo 1, inhiben la replicación viral, es a través de la interrupción de la vía de señalización de protein quinasa C (PKC).⁴¹

La activación de protein quinasa C es esencial para la replicación del virus de la influenza, debido a que las α -defensinas son potentes inhibidores de la protein quinasa C, se demostró que el tratamiento con HNP-1 inhibe la fosforilación de PKC inducida por el virus de la influenza.⁴¹ La función mejor caracterizada es la inhibición de la isoforma PKCIIb por lo cual se interrumpe la vía endosomal del virus de influenza.⁴¹

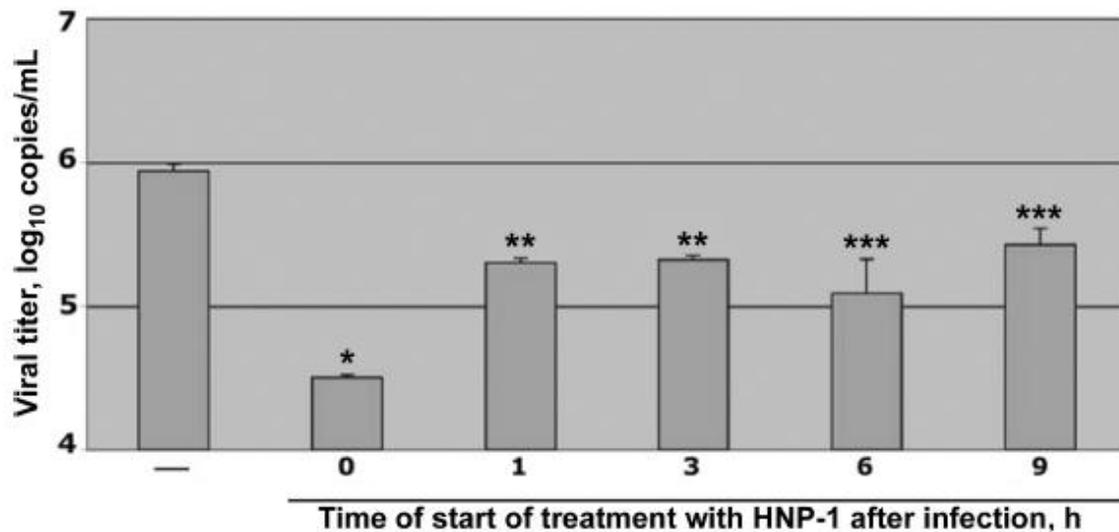


Figura 8. Efecto de las α -defensinas dependiente del tiempo, sobre la replicación del virus de influenza. En este estudio se infectaron células renales de bovino con virus de influenza H1N1, se administró HNP-1 (20mg/ml) y se observó durante 24 hrs. Los títulos virales en los sobrenadantes se determinaron mediante el ensayo en la placa reportándose: * $P= 0.006$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.05$ para el control de las células infectadas no tratadas vs las células tratadas con HNP-1 (Student's t test).

En los seres humanos, la liberación de α -defensinas por neutrófilos activados podría ayudar a inhibir la replicación del virus de influenza en los pulmones. Debido a que las α -defensinas inducen la liberación de IL-8, un potente quimioatrayente de neutrófilos, induce la liberación de α -defensinas por parte de los mismos; los cuales podría amplificar la liberación de α -defensinas reclutando neutrófilos adicionales⁴¹.

Mecanismo de neutralización de adenovirus por medio de α -defensinas

En el 2008, Smith y col., explican el mecanismo general por el cual las α -defensinas tipo 1 y las defensinas humanas 5, antagonizan a los serotipos de adenovirus 5 y 35. Refieren que las α -defensinas se unen directamente a la cápside de adenovirus, lo que interfiere con el desarrollo y produce cambios en su conformación, que se cree que se requiere para la exposición de la cápside, lo que facilita que salga el virus de los compartimientos del genoma viral, bloqueando de esta manera la penetración del virus a la membrana celular del huésped.⁴²

El adenovirus es un virus sin envoltura con un genoma de 36 Kb de ADN bicatenario, existen 51 serotipos reconocidos de adenovirus divididos en 6 especies de la A a la F. El virus de adenovirus son patógenos comunes que afectan el tracto respiratorio, gastrointestinal, y ocular, en pacientes

inmunocompetentes se autolimita la infección, sin embargo en pacientes inmunocomprometidos como pacientes con SIDA o pacientes pediátricos con trasplante de médula ósea, con frecuencia pueden causar infecciones graves.^{43,44}

Se han realizado varios estudios en los cuales se demuestra la inhibición de infección por adenovirus, uno de ellos realizado por Bastian y Schafer en el 2001, Gropp et al, 199, y Harvey et al, 2005.⁴³

En el siguiente estudio se midió el porcentaje de células infectadas positivas las cuales se añadió HNP-1 comparado con células infectadas en ausencia de HNP-1, posterior a 18-22 hrs. Se observó que adenovirus se inhibió aproximadamente 20 veces en la concentración más alta CI50 entre 5 y 6 mM, mientras que la defensina humana 5 (HD5) fue más potente y capaz de inhibir de forma completa observándose CI50 entre 3 y 4 mM. En contraste con la β -defensina humana tipo 2, que no demostró inhibir las concentraciones de Ad5.F5 a una concentración de 15 mM.⁴³

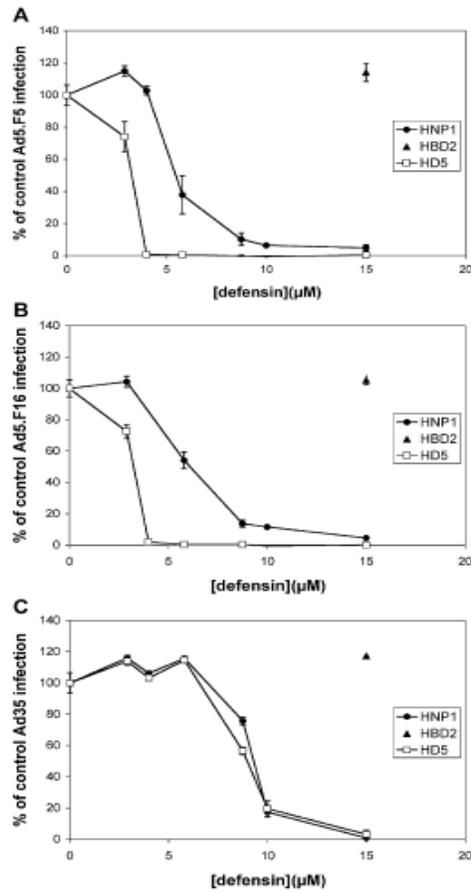


Figura 9. Inhibición de infección de Adenovirus por medio de α -defensinas humanas, independientemente de la especificidad del receptor principal Ad5.F5 (A), Ad5.F16 (B), Ad35.eYFP (C), en presencia de concentraciones elevadas de HNP-1 (circulo) β -defensinas humanas tipo 2 (triangulo) ó Defensina humana 5 (cuadrado).⁴³

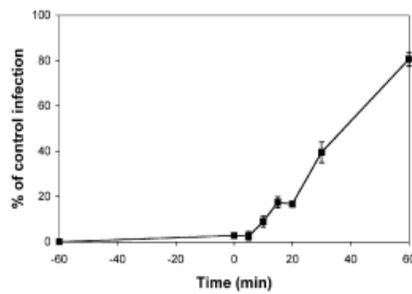


Figura 10. Inhibición temprana de infección por adenovirus (Ad5.F5) por defensina humana 5 (HD5). El tiempo 0 es el inicio de la incubación a 37°C, y el tiempo negativo se refiere a la incubación viral en ausencia de HD5 a 4°C. Los datos que se observan en la grafica, son el porcentaje promedio de las células positivas a adenovirus, en comparación con el control de la infección en ausencia de HD5, el cual fue reportado por triplicado.⁴³

Concentraciones fisiológicas de α -defensinas

La cuantificación de las concentraciones fisiológicas de defensinas in vivo, es compleja, las defensinas pueden estar presentes en altas concentraciones en células específicas (un ejemplo en criptas de intestino delgado), y puede disminuir en líquido extracelular. Las α -defensinas se encuentran en aproximadamente 10mg/ml en neutrófilos, se encuentra incluso en mayores concentraciones en los granulos azurófilos; Ayabe et al. Calculó concentraciones de defensinas humanas tipo 5 y 6 $\geq 3,5$ mm (15-100 mg/ml) en lumen de la cripta, en las células de Paneth.¹¹

En pacientes sanos, revestimiento epitelial del pulmón se estima que contiene 31-79 nM de HNP 1-3, secreción nasal contiene 2.7 μ M de HNP 1-3, la saliva contiene 0.3-3 μ M de HNP 1-3, y las secreciones vaginales contienen 1.5 μ M de HNP 1-3 y 0.3-14 μ M de defensina humana 5.¹¹ En ciertas enfermedades los niveles de defensinas pueden ser muy elevados. Por ejemplo, 57 μ M hasta concentraciones 2.4 mM de HNP 1 han sido encontrados en secreción epitelial de pacientes con fibrosis quística.¹¹

Efectos antivirales VIH-1

Se reporta que las células T CD8+ producen α -defensinas, o lo trasladan de los polimorfonucleares, el cual mejora la función y beneficia al hospedero, en la cual se describe la actividad anti-VIH por parte de HNP 1-3 y su traslado por las células T CD8+.

La investigadora Teresa Chang y María Klotman^{3,32} llegaron a la conclusión de que las HNP 1 tiene efectos inhibitorios sobre la replicación de VIH-1, con inactivación viral de forma directa, mediada por efectos sobre la célula diana, debido a la interrupción de la cascada de la señalización a través de la proteína quinasa C (PKC).^{3,32}

Se han realizado varios estudios entre los cuales causaban controversia, sobre los hallazgos experimentales que demostraban la pérdida de actividad de VIH-1 en el sobrenadante de las células T CD8 estimuladas por alimentadores alogénicos, el cual se observó que las α -defensinas tenía potencia antiviral contra VIH-1 y se reconoce que las células T CD8+ no producían HNP 1-3, pero que se habían importado estas defensinas a partir de células co-cultivadas a través de la capa de alimentación.

Trabattoni et.al examinaron la mucosa y la expresión sistémica de defensinas en nueve personas seronegativas expuestas, que no se habían infectado a pesar de múltiples exposiciones sexuales a sus parejas infectadas con VIH-1. Ellos encontraron un mayor número de producción de α -defensinas, y también se encontraban en linfocitos T CD8, sangre periférica y mucosa de área genital, se encontró un aumento de RNA mensajero de α -defensinas en células mononucleares de sangre periférica y en las biopsias de cuello uterino⁴⁰.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se desconoce si existe la presencia de α -defensinas en el trayecto respiratorio y si su síntesis tiene relación con infecciones virales específicas. Por lo tanto nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿Existe síntesis de α -defensinas durante la infección viral del tracto respiratorio superior?

V. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones respiratorias agudas son una causa importante de morbi-mortalidad en niños en el mundo, hasta un 70% de estas infecciones son de etiología viral. Los datos que reportan la etiología de manera concreta en nuestro país son limitados y se centran a reportes en unidades de tercer nivel.

La mayoría de los agentes involucrados no generan una respuesta inmune adaptativa eficiente que impida la re-infección, los hallazgos en la respuesta innata permitiría además de la contribución a la fisiopatología, considerar aproximaciones inmunoterapéuticas que pudiesen proveer alternativas en la profilaxis de infecciones del tracto respiratorio superior.

Hasta el momento se desconoce la participación de las α defensinas en el tracto respiratorio superior durante la infección viral aguda.

VI.HIPÓTESIS

La infección viral aguda induce la síntesis de α -defensinas en el tracto respiratorio superior como parte de los mecanismos involucrados en la respuesta inmune innata.

VII. OBJETIVOS

VII.I Objetivo general

Conocer si existe síntesis de α -defensinas HNP 1, y 3 en la infección viral aguda del tracto respiratorio superior en pacientes escolares.

VII.II. Objetivos particulares

1. Asociar la presencia de α -defensinas HNP 1 y 3 con el agente etiológico viral detectado en la secreción nasal de los pacientes con infección del tracto respiratorio alto.
2. Comparar los niveles de α -defensinas HNP 1 y 3 durante y posterior a la resolución de la infección vírica
3. Describir los niveles de α -defensinas HNP 1 y 3 en la infección por un solo agente etiológico viral en comparación a la infección viral.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL:

Tipo de estudio transversal, el cual se incluyó un grupo de estudio con pacientes que presenten cuadro clínico de infección respiratoria alta y ésta fue sugerente de etiología viral. Se obtuvo una muestra de secreción nasal y se realizó inmunofluorescencia para detección de agentes virales, a las muestras positivas se cuantificaron los niveles de α -defensinas por medio de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).

POBLACIÓN EN ESTUDIO

Los pacientes con infección de vías respiratorias altas fueron reclutados en la escuela primaria Rey Tizoc, son niños mexicanos entre 6-12 años, género indistinto, cualquier grado escolar, sin tratamiento antiviral, antibiótico o corticoesteroide durante ese proceso infeccioso. (Previo consentimiento, asentimiento informado aceptado junto con aviso de confidencialidad y privacidad de datos) (Ver anexo 1, 2 y 5). Es un estudio piloto, por lo cual se eligió un tamaño de la muestra a conveniencia de 60 pacientes. Se elaboró registro de signos y síntomas respiratorios de los niños participantes en el estudio, para la fenotipificación específica de acuerdo al virus. (Ver anexo 4)

TOMA DE LA MUESTRA

Durante el cuadro respiratorio, se tomó una muestra de secreción por aspirado nasal, la muestra se resuspendió 1:10 en medio de transporte viral F12, y se transportó en hielo de inmediato al laboratorio para su procesamiento. Se tomo

muestras en periodos asintomáticos 3 semanas posterior a la recuperación del evento infeccioso, las cuales se usaron como control, (Ver anexo 3). Detección viral: Se realizó Inmunofluorescencia que se realiza por medio del kit (IFA panel para la detección e identificación de los virus respiratorios) Light diagnostics® (Ver anexo 8), sistema de diagnóstico para detección e identificación de virus respiratorios en panel.

DETECCIÓN VIRAL

El procesamiento se llevó a cabo en el laboratorio de inmunogenética para confirmar el proceso infeccioso viral e identificar al agente causante. , Se elaboraron las siguientes secuencias, de las cuales se identificó *Influenza A*, e *Influenza B*; *Parainfluenza 1, 2, 3*, *Virus sincitial respiratorio (VSR)*, (Ver Anexo 8)

ELISA PARA α -DEFENSINAS

Las α defensinas HNP1 y HNP3 se identificaron en el sobrenadante de las muestras mediante un ELISA de fase solida (Cloud-Clone Corp for Defensin alpha 1 y 3, neutrophil). Se usó un anticuerpo trazador conjugado con biotina para la captura y un conjugado estreptoavidina-peroxidasa para revelar la reacción, mediante el sustrato tetrametilbencidina (TMB). Se usaron proteínas recombinantes para elaborar las curvas de referencia respectivas. (Anexo 6, 7)

MÉTODO ESTADÍSTICO:

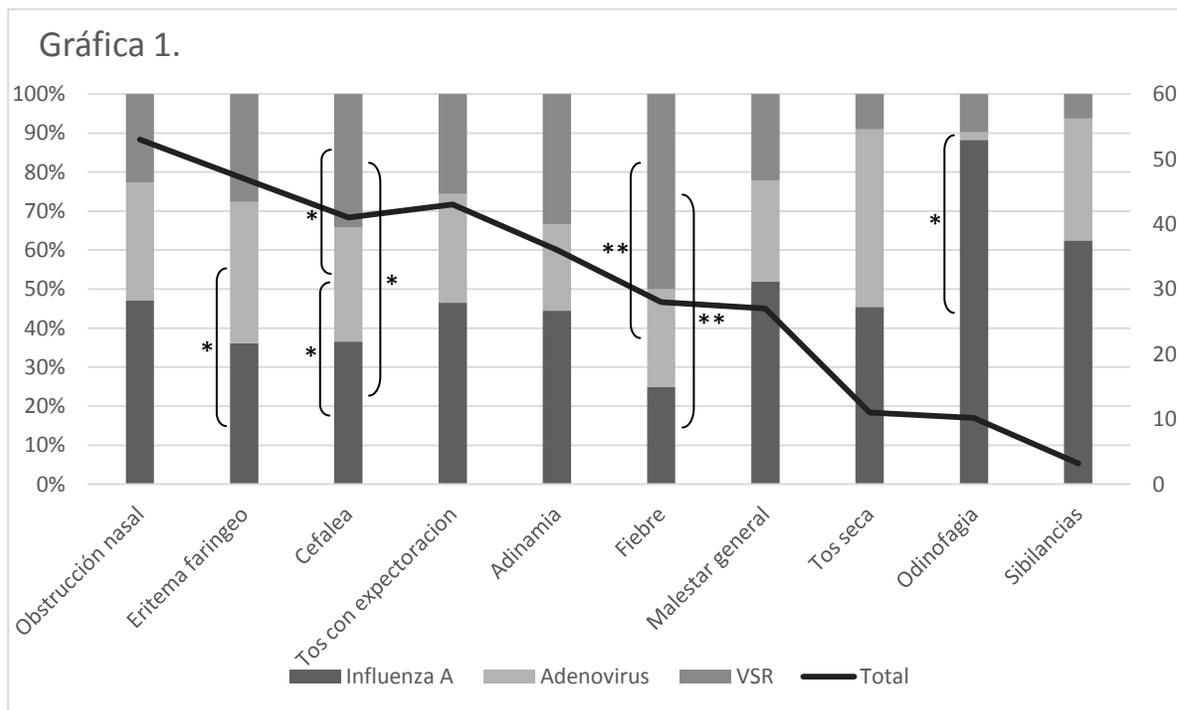
A todas las variables del estudio se les realizó prueba de normalidad con test de Shapiro Wilkins ó Kolmagrou Smirnov, dependiendo de su comportamiento a las variables cuantitativas se decidió realizar prueba de T pareada ó Wilkcoxon para realizar las asociaciones entre el tipo de virus y la inducción de α -defensinas, se utilizó la prueba de χ^2 y se realizaron pruebas de correlación con las pruebas de Spearman o Pearson. los resultados se analizarán con el programa SPSS V.21.

IX. RESULTADOS

Se analizaron un total de 80 muestras obtenidas de 55 niños, con síntomas de infección respiratoria viral corroborada por inmunofluorescencia. La distribución de género fue 50 pacientes mujeres y 5 hombres, con un promedio de edad de 8.3 años, y una desviación estándar de 1.63. En 25 niños con infección por influenza A o adenovirus, se tomaron muestras de lavado nasal tres semanas posteriores a la remisión del proceso infeccioso y se corroboró negatividad por medio de inmunofluorescencia.

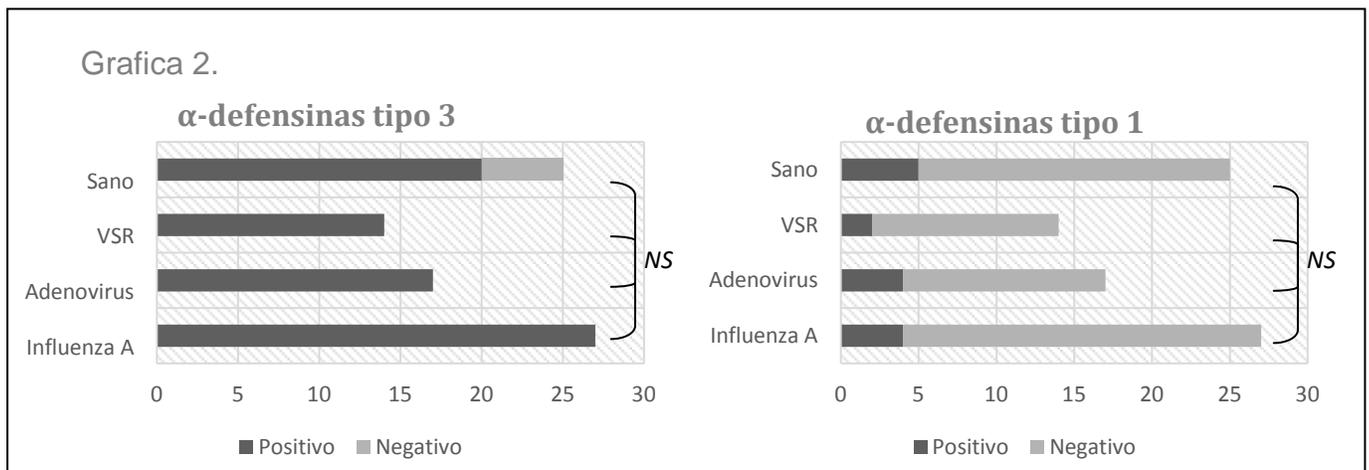
Tabla 2. Características demográficas y de la enfermedad en la población de estudio (n=55)	
Demográficas	
Edad (años) (promedio±DE)	8.3±1.63
Género femenino, n (%)	50 (91%)
Género masculino, n (%)	5 (9%)
Muestras positivas para virus	
Influenza A, n (%)	27 (49%)
Adenovirus, n (%)	17 (31%)
Virus Sincitial Respiratorio, n (%)	14 (25.4%)
Co-infecciones, n (%)	3 (5.4%)
Control post-infección n	
Influenza A	15
Adenovirus	10
Características clínicas	
Obstrucción nasal, n (%)	53 (96.3%)
Eritema faríngeo, n (%)	48 (87.2%)
Cefalea, n (%)	44 (80%)
Tos con expectoración, n (%)	43 (78%)
Adinamia, n (%)	36 (65.4%)
Fiebre, n (%)	18 (32.7%)
Malestar general, n (%)	27 (49%)
Tos seca, n (%)	11 (20%)
Odinofagia, n (%)	10 (18.1%)
Sibilancias, n (%)	3 (5.4%)

Las 55 muestras consideradas como positivas para virus, presentaron inmunofluorescencia positiva para el diagnóstico de infección por: influenza A, virus sincitial respiratorio y adenovirus. Tres de las 55 muestras con infección, presentaron inmunofluorescencia positiva para dos virus, dos de ellas para adenovirus e influenza y otra más con influenza y virus sincitial respiratorio. En la tabla 1 y figura 1 se enumeran y resumen la frecuencia de las características clínicas.



Gráfica 1. Frecuencia y proporción de características clínicas. Características clínicas agrupadas por agente infeccioso. La línea total representa la frecuencia de los síntomas. Las barras representan las proporciones, se realizó χ^2 * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

De acuerdo a los resultados de positividad en las muestras para infección viral, se realizaron los análisis de asociación, entre el diagnóstico del agente causal y los valores de α -defensinas tipo 1 (HNP-1) y α -defensinas tipo 3 (HNP-3). De las 80 muestras, 15 (18%) tuvieron valores detectables para α -defensinas tipo 1, mientras que 75 (90%) muestras tuvieron valores detectables para α -defensinas tipo 3, no se documentó diferencia significativa en la proporción de α -defensinas tipo 1 y 3 presentes en los tres diferentes grupos de infección y los controles sanos. Gráfica 2

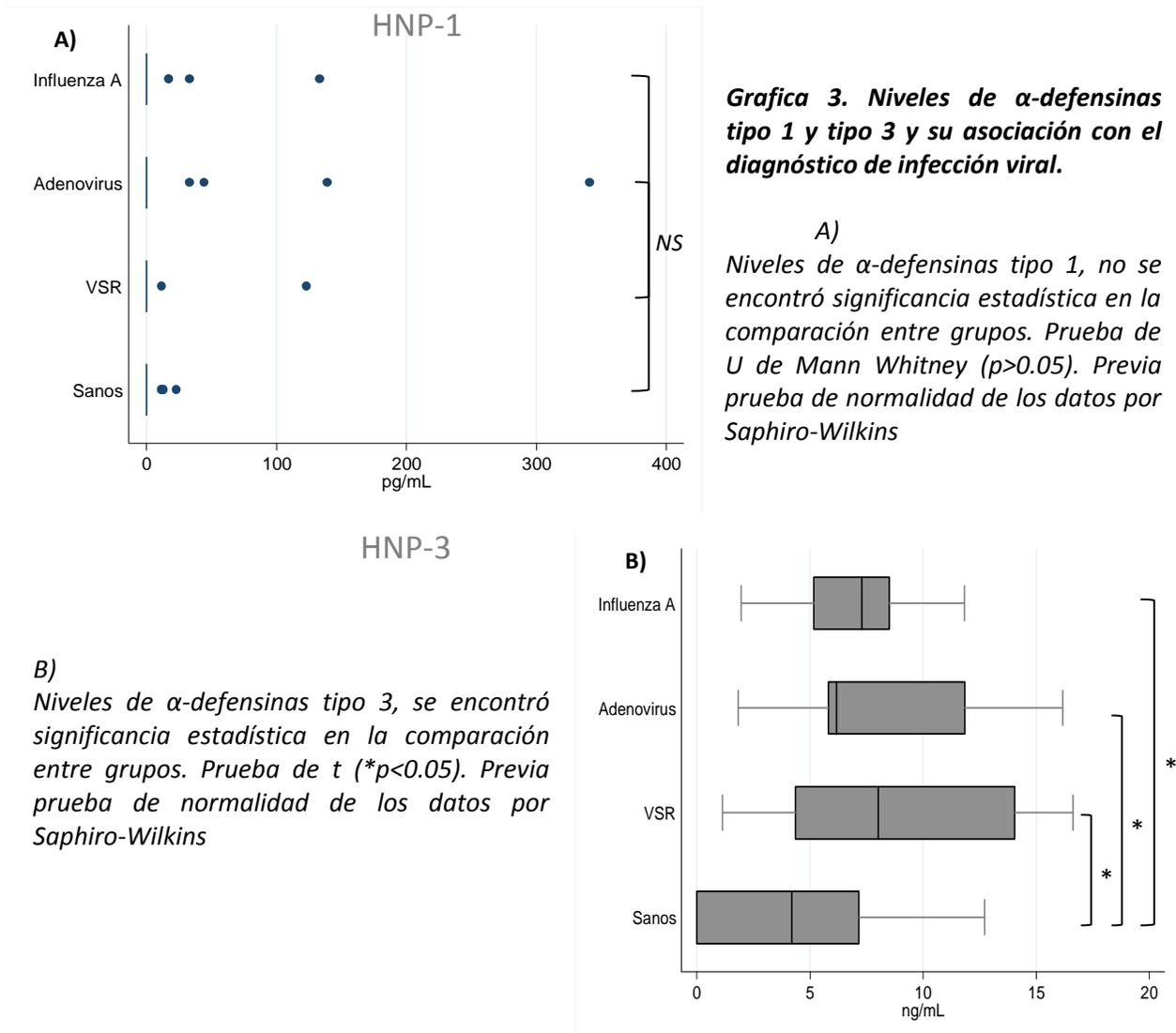


Grafica 2. Presencia de α -defensinas tipo 1 y 3. Proporción de muestras con niveles detectables de α -defensinas tipo 1 y 3, se realizó χ^2 sin encontrar diferencia significativa entre los grupos

A pesar de no encontrar diferencia en la presencia de α -defensinas entre los diferentes grupos tanto del tipo 1 y tipo 3, en ésta última se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles cuantificados entre cada una de las categorías establecidas por agente infeccioso y los controles sanos: Influenza A vs sanos $p= 0.0018$ [IC 95% 4.51 - 6.47], Adenovirus vs sanos $p= 0.0012$ [IC 95% 4.32

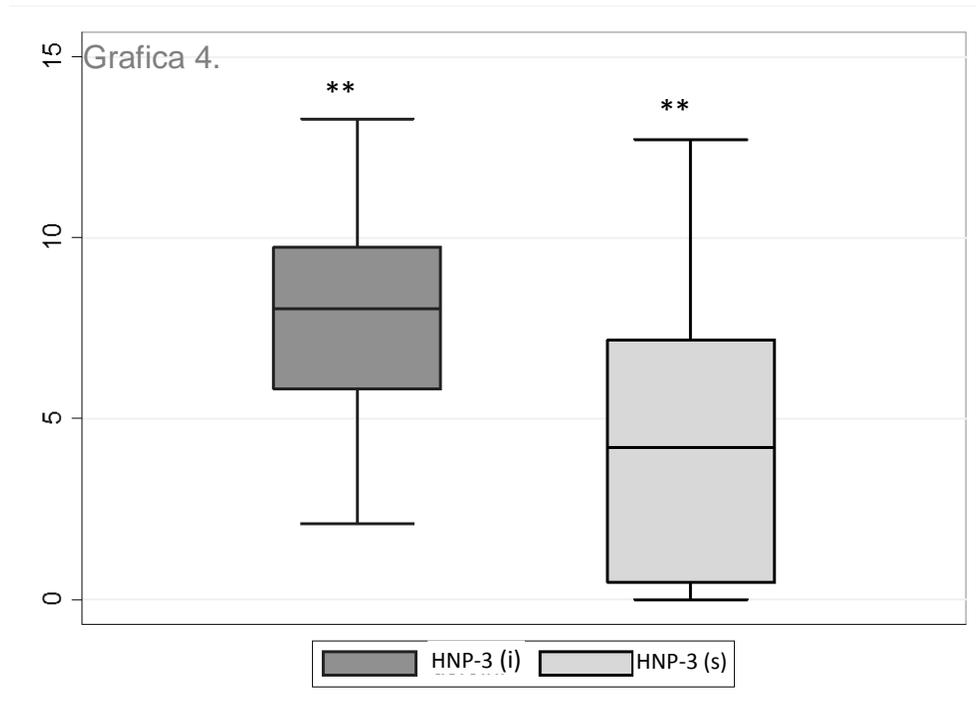
- 7.01], VSR vs sanos $p= 0.004$ [IC 95% 4.14 - 7.41]. En el caso de la α -defensina tipo 1 no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Grafica 3.

Grafica 3.



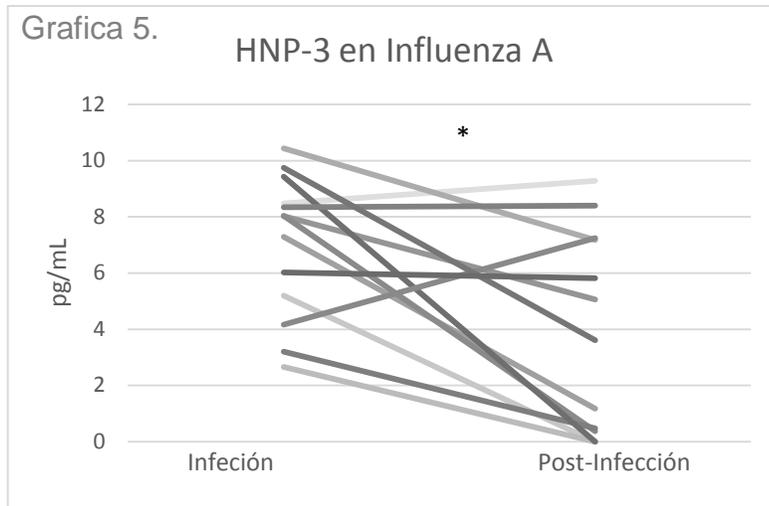
No se encontró diferencia significativa al comparar los niveles de α -defensina tipo 1 en las muestras con positividad para infección viral vs los controles (lavados nasales negativos a inmunofluorescencia) post-infección tres semanas después de la resolución de los síntomas. No obstante el análisis cuantitativo en los niveles de α -

defensinas tipo 3, si demostró un descenso significativo en los valores detectables de esta proteína en los controles post-infección, tanto para infección por Influenza A y Adenovirus. Gráfica 4.

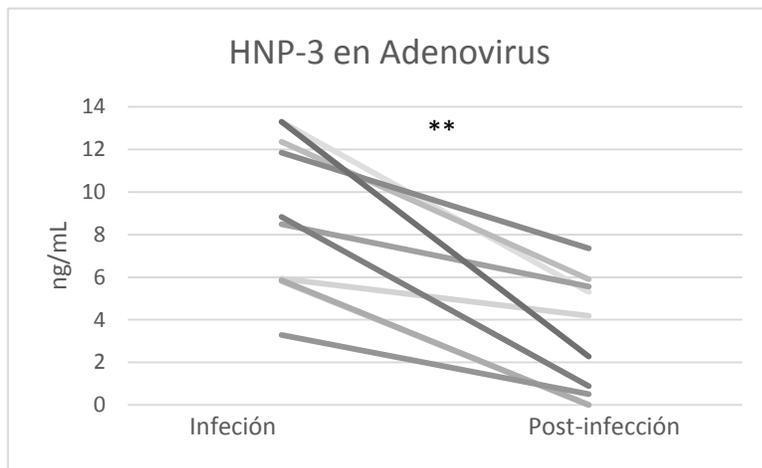


Gráfica 4. Descenso de los niveles de α-defensina tipo 3 post-infección. Disminución estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) en los niveles de α-defensina tipo 3 durante la infección [HNP-3 (i)] y tres semanas posteriores a la resolución de los síntomas [HNP-3 (s)]. Se realizó prueba de *t* pareada, previa prueba de normalidad de los datos por Saphiro-Wilkins

Se corroboró si el descenso significativo de los valores de α-defensinas tipo 3 post-infección era diferente de acuerdo al virus causante de la infección. Esto se demostró tanto en el grupo infectado por influenza A y adenovirus, sin embargo la significancia estadística fue mayor en el grupo de pacientes infectados por adenovirus: $p = 0.027$ [IC 95% 0.064 - 4.702], $p = 0.0001$ [IC 95% 3.675 - 7.738] respectivamente. Gráfica 5.



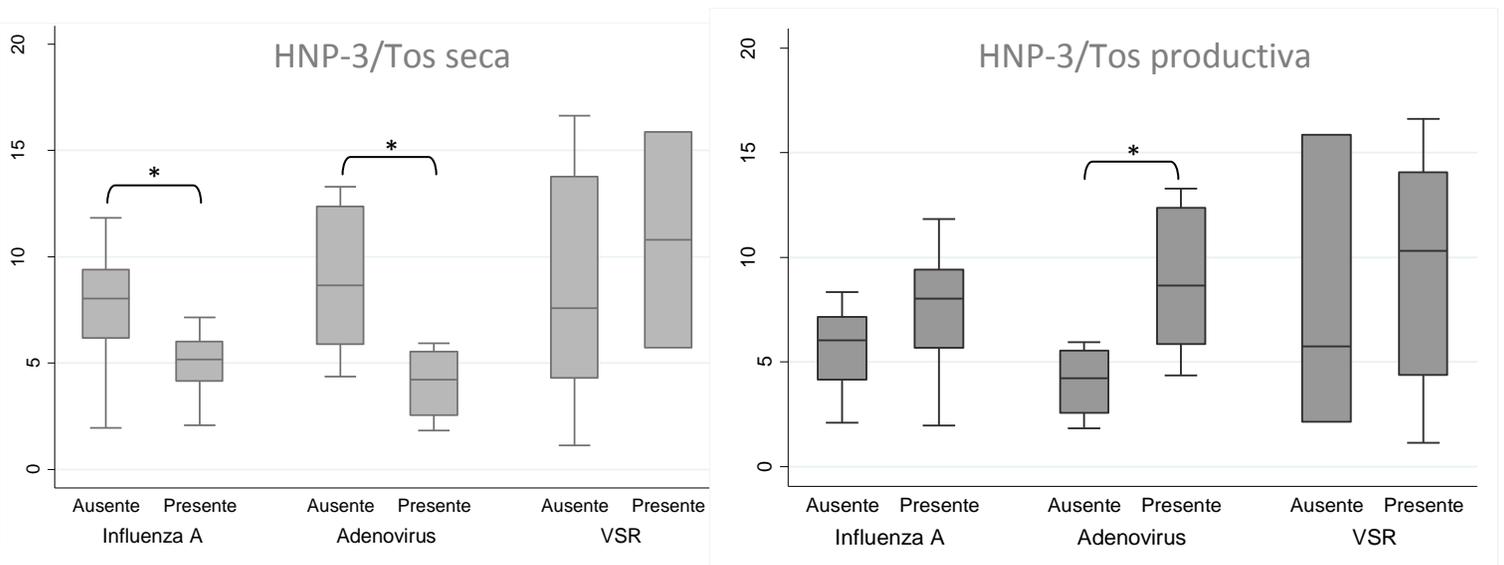
Grafica 5. Descenso de los niveles de α -defensinas tipo 3 en la resolución de la infección por Influenza A (A) y Adenovirus (B). Se encontró diferencia estadísticamente significativa. Se realizó prueba de t pareada, previa prueba de normalidad de los datos por Saphiro-Wilkins. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$)



Se buscó asociación entre los síntomas clínicos y los niveles de α -defensinas, encontrando solo valores estadísticamente significativos entre los niveles de HNP-3 y la presencia de tos, tanto productiva como seca en la infección viral, encontrando que los valores de HNP-3 son mayores en aquellos pacientes con tos productiva ($p= 0.016$) y menores en los que no presentan tos seca ($p= 0.027$). Al realizar el análisis estratificado, se documentó que el poder estadístico se encuentra en el grupo de infección por adenovirus: Los valores de HNP-3 en pacientes con infección por adenovirus,

son mayores en aquellos pacientes que tienen tos productiva ($p= 0.023$). En los pacientes con influenza se encontraron niveles más elevados de HNP-3 en aquellos que no presentan tos ($p= 0.03$).

Gráfica 6.



Gráfica 6. α-defensinas tipo 3 y su asociación con la presencia de tos seca y productiva. Niveles de α-defensinas asociados a tos seca y productiva estratificados por tipo de infección. La diferencia significativa fue mayor en el grupo de pacientes infectados por adenovirus (* $p= 0.05$), se realizó U de Mann Whitney, previa prueba de normalidad de las variables con Shapiro Wilkins.

X.DISCUSIÓN

El principal objetivo de este estudio era corroborar la presencia de α defensinas en la secreción nasal durante los procesos infecciosos virales. Dentro de nuestras primeras interrogaciones era conocer si existían valores basales de HNP-1 o HNP-3 y si estas se modificaban con los procesos infecciosos, por tal motivo empleamos controles sanos (pacientes con resolución de la infección) para corroborar la existencia de niveles basales de estos péptidos antimicrobianos. La cuantificación fisiológica de las concentraciones de defensinas *in vivo* es compleja, debido a que las defensinas se encuentran presentes a elevadas concentraciones a nivel local en diversos tejidos que presentan un linaje celular específico, tal es el caso de las criptas del intestino delgado, sin embargo estas concentraciones se muestran diluidas al momento de analizar los fluidos extracelulares, como en el caso de la secreción nasal. Se tiene estimado que la concentración de α defensinas en los neutrófilos es aproximadamente de 10 mg/ml con concentraciones aún mayores en los gránulos azurófilos. A nivel del sitio donde degranulan las células de Paneth en las criptas intestinales, se estiman concentraciones que varían de 15-100 mg/mL.¹¹ Se han podido estimar las concentraciones de HNP 1-3 en sujetos sanos a nivel de saliva, fluido pulmonar y secreción vaginal, incluso en la secreción nasal se han determinado cifras de éstos péptidos en su conjunto (no en sus tres diferentes isoformas) en valores que oscilan entre 9 a 9.4 μ g/mL.⁴⁶ Los estudios previos se habían enfocado principalmente en las concentraciones de HNP 1 y en enfermedades específicas, por ejemplo, en secreción epitelial de pacientes con

fibrosis quística han sido encontrados niveles que oscilan de 57 μM hasta 2.4 mM de HNP 1.⁴⁷ En nuestro ensayo, encontramos valores basales de HNP-3 de las 80 muestras, 75 muestras (90%) tuvieron valores detectables para α -defensinas tipo 3, de las cuales 20 muestras (80%) (en sujetos sin infección) se encontraron niveles perceptibles, por lo que inferimos que la producción de α -defensina 3 siempre está presente y en el momento de algún proceso infeccioso (en este caso de tipo viral) se incrementan los niveles, como se demostró en las muestras infectadas por adenovirus e influenza A de los cuales se encontró una diferencia significativa, sin embargo se observó que el grupo de muestras de pacientes infectados por adenovirus fue mayor, tratando de asociar si tenía alguna interacción con adenovirus, se realizó una búsqueda intencionada en la cual recientemente se reportó evidencia que las α -defensinas humanas bloquean la replicación de adenovirus.^{3, 31} Debido a la capacidad de HNP 1-3 para bloquear la señalización, protein quinasa C (PKC), el cual refiere que puede contribuir a disminuir los efectos sobre la infección por adenovirus serotipo 5.³ En cambio encontramos que la producción de HNP-1 en secreción nasal, fue mínima, no hubo diferencia entre muestras de pacientes sanos o infectados, y los valores no oscilaron en ninguna de las dos situaciones, cabe mencionar que esto difiere de la literatura, pues la mayoría de los estudios se han realizado con α -defensina 1.

En un artículo reportado por Smith et.al se demostró la inhibición de infección de Adenovirus por medio de α -defensinas humanas, independientemente de la especificidad del receptor principal Ad5.F5, Ad5.F16, Ad35.eYFP, en presencia de concentraciones elevadas de HNP-1, β -defensinas humanas tipo 2, ó Defensina

humana 5.⁴³ En 2008 Smith y colaboradores, explican el mecanismo general por el cual las α -defensinas tipo 1 y las defensinas humanas 5, antagonizan a los serotipos de adenovirus 5 y 35. Refieren que las α -defensinas se unen directamente a la cápside de adenovirus, lo que interfiere con el desarrollo y produce cambios en su conformación, que se cree que se requiere para la exposición de la cápside, lo que facilita que salga el virus de los compartimientos del genoma viral, bloqueando de esta manera la penetración del virus a la membrana celular del huésped.⁴²

Con estos argumentos encontrados podemos proponer que así como se han realizado estudios con HNP-1 sobre la inhibición de ciertos virus, en especial adenovirus e influenza, HNP-3 también puede interferir en la inhibición de estos virus, en especial adenovirus, debido al incremento de valores perceptibles en ELISA para HNP-3 de muestras de sobrenadantes de secreción nasal,

Al analizar la asociación de los valores de HNP-1 y 3 con sintomatología clínica, la única asociación que se encontró de manera proporcional con los niveles de HNP-3 fue la presencia de tos productiva, ya hemos mencionado y documentado en múltiples ocasiones, que los niveles de α -defensinas incrementan en procesos infecciosos, en ciertas enfermedades los niveles de defensinas pueden ser muy elevados, principalmente a nivel pulmonar, por ejemplo, de 57 μ M hasta concentraciones de 2.4 mM de HNP 1 han sido encontrados en secreción epitelial de pacientes con fibrosis quística.¹¹ En un artículo reportado por Ishimoto y colaboradores, en 2008, se demuestra que la HNP-1 activa directamente la expresión del RNAm de la proteína de Mucina 5AC, lo que sugiere una asociación

entre HNP-1 y la hipersecreción de mucina.⁴⁵ a diferencia de lo que se encontró en este estudio, nosotros inferimos que muy probablemente la HNP-3 la que probablemente incrementa la expresión de la proteína Mucina 5AC por las concentraciones encontradas en muestras de pacientes con secreción.

XII. CONCLUSIONES

1. Se encontraron valores detectables de α -defensina 1, como de α -defensina 3, tanto en muestras de sobrenadante con proceso infeccioso viral y en los controles sanos.
2. No se observó diferencia significativa en cuanto a la proporción de sujetos; sin embargo los niveles cuantitativos de HNP-3 son significativamente mayores en muestras infectadas con adenovirus en primer lugar y en segundo lugar con influenza A.
3. Se demostró que los niveles de HNP-3 presentan reducción de los valores detectables cuando existe resolución del proceso infeccioso.
4. La única asociación encontrada con el cuadro clínico y los niveles de HNP-3 fue la presencia de tos productiva.
5. Se observó prevalencia de niveles detectables de α -defensina 3, sobre α -defensina 1, tanto en muestras positivas a proceso infeccioso, como en sujetos sanos.

XII. REFERENCIAS

1. Gursoy UK, Könönen E, Luukkonen N, Uitto VJ. Human neutrophil defensins and their effect on epithelial cells. J Periodontol. 2013 Jan;84(1):126-33.
2. Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. Clin Immunol. 2010 Apr;135(1):1-11.
3. Robert I. Lehrer, Wuyuan Lu, α -Defensins in human innate immunity. Immunological Reviews . 2012 Jan;245(1):84-112.
4. De Leeuw E, Li C, Zeng P, Li C, Diepeveen-de Buin M, Lu WY, Breukink E, Lu W. Functional interaction of human neutrophil peptide-1 with the cell wall precursor lipid II. FEBS Lett. 2010 Apr 16;584(8):1543-8.
5. Guaní-Guerra E, Negrete-García MC, Montes-Vizuet R, Asbun-Bojalil J, Terán LM Human β -defensin-2 induction in nasal mucosa after administration of bacterial lysates. Arch Med Res. 2011 Apr;42(3):189-94
6. Linzmeier R, Michaelson D, Liu L, Ganz T. The structure of neutrophil defensin genes. FEBS Lett 1993;321:267–273.
7. Jones DE, Bevins CL. Defensin-6 mRNA in human paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. FEBS Lett 1993;315:187–192.
8. Bdeir K, Higazi AA, Kulikovskaya I, Christofidou-Solomidou M, Vinogradov SA, Allen TC, Idell S, Linzmeier R, Ganz T, Cines DB. Neutrophil alpha-defensins cause lung injury by disrupting the capillary-epithelial barrier. Am J Respir Crit Care Med. 2010 May 1;181(9):935-46.

9. Ouellette AJ. Paneth cell α -defensins in enteric innate immunity. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Jul;68(13):2215-29.
10. Amenomori M, Mukae H, Ishimatsu Y, Sakamoto N, Kakugawa T, Hara A, Hara S, Fujita H, Ishimoto H, Hayashi T, Kohno S. Differential effects of human neutrophil peptide-1 on growth factor and interleukin-8 production by human lung fibroblasts and epithelial cells. *Exp Lung Res*. 2010 Sep;36(7):411-9.
11. Wilson S, Wiems M, Smith J. Antiviral mechanism of human defensins. *J Mol Biol*. 2013 Oct; doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.038
12. Grünberg K, Timmers MC, Smits HH, de Klerk EP, Dick EC, Spaan WJ, Hiemstra PS, Sterk PJ. Effect of experimental rhinovirus 16 colds on airway hyperresponsiveness to histamine and interleukin-8 in nasal lavage in asthmatic subjects in vivo. *Clin Exp Allergy* 1997;27:36-45
13. Belda J, Parameswaran K, Keith PK, Hargreave FE. Repeatability and validity of cell and fluid-phase measurements in nasal fluid: a comparison of two methods of nasal lavage. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1111-5
14. M. Zanetti, R. Gennaro, D. Romeo, Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable Cterminal antimicrobial domain, *FEBS Lett*. 374 (1995) 1–5.
15. J.B. Cowland, A.H. Johnsen, N. Borregaard, hCAP-18, a cathelin/proactenecin-like protein of human neutrophil specific granules, *FEBS Lett*. 368 (1995) 173–176.
16. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem*. 1996;238:325-332.
17. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stähle-Bäckdahl M, Lidén S, Wigzell H, Gudmundsson GH. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* 1997;272:15258-15263

18. Sorensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, Borregaard N. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* 2001;97:3951-3959
19. Murakami M, Lopez-Garcia B, Braff M, Dorschner RA, Gallo RL. Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. *J Immunol* 2004;172:3070-3077
20. Zasloff M. Inducing endogenous antimicrobial peptides to battle infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:8913-8914
21. Chromek M, Slamová Z, Bergman P, Kovács L, Podracká L, Ehrén I, Hökfelt T, Gudmundsson GH, Gallo RL, Agerberth B, Brauner A. The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nat Med* 2006;12:636-641.
22. Kim ST, Cha HE, Kim DY, Han GC, Chung YS, Lee YJ, Hwang YJ, Lee HM. Antimicrobial peptide LL-37 is upregulated in chronic nasal inflammatory disease. *Acta Otolaryngol* 2003;123:81-85.
23. Lau YE, Bowdish DM, Cosseau C, Hancock RE, Davidson DJ. Apoptosis of airway epithelial cells: human serum sensitive induction by the cathelicidin LL-37. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:399-409.
24. Tang YQ, Yuan J, Osapay G, Osapay K, Tran D, Miller CJ, Ouellette AJ, Selsted ME. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* 1999;286:498-502.
25. Daly NL, Chen YK, Rosengren KJ, Marx UC, Phillips ML, Waring AJ, Wang W, Lehrer RI, Craik DJ. Retrocyclin-2: structural analysis of a potent anti-HIV theta-defensin. *Biochemistry* 2007;46:9920-9928.
26. Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, Levitz SM, Diamond RD, Offner GD, Troxler RF: Histatins, a novel family of histidina-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1988;263:7472-7477.
27. vanderSpek JC, Wyandt HE, Skare JC, Milunsky A, Oppenheim FG, Troxler RF. Localization of the genes for histatins to human chromosome 4q13 and tissue distribution of the mRNAs. *Am J Hum Genet* 1989;45:381-387.

28. Ganz T. Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1987;55:568–571.
29. Panyutich AV, Panyutich EA, Krapivin VA, Baturevich EA, Ganz T. Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis. *J Lab Clin Med* 1993;122:202–207.
30. Arnljots K, Sorensen O, Lollike K, Borregaard N. Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells. *Leukemia* 1998;12:1789–1795
31. Nguyen EK, Nemerow GR, Smith JG. Direct evidence from single-cell analysis that human α -defensins block adenovirus uncoating to neutralize infection. *J Virol* 2010;84:4041–4049.
32. Chang TL, Vargas J Jr, DelPortillo A, Klotman ME. Dual role of alpha-defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity. *J Clin Invest* 2005;115:765–773.
33. Agerberth B, et al. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alphas-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 2000;96:3086–3093.
34. Morel E, et al. Expression of alpha-defensin 1-3 in T cells from severe cutaneous druginduced hypersensitivity reactions. *Allergy* 2011;66:360–367
35. Arnett E, Lehrer RI, Pratikhya P, Lu W, Seveau S. Defensins enable macrophages to inhibit the intracellular proliferation of *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* 2011;13:635–651.
36. Tan BH, et al. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. *J Immunol* 2006;177:1864–1871
37. Cohn ZA, Parks E. The regulation of pinocytosis in mouse macrophages. II. Factors inducing vesicle formation. *J Exp Med* 1967;125:213–232.
38. Wu Z, et al. Human neutrophil alpha-defensin 4 inhibits HIV-1 infection in vitro. *FEBS Lett* 2005;579:162–166
39. Welkos S, et al. Humanized θ -defensins (retrocyclins) enhance macrophage performance and protect mice from experimental anthrax infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4238–4250.
40. Trabattoni D, et al. Human alpha defensin in HIV-exposed but uninfected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;35:455–463.

41. Mirella Salvatore, Adolfo García-Sastre, Piotr Ruchala, *The Journal of Infectious Diseases* 2007; 196:835–43
42. Christopher B. Buck, Defensins' Offensive Play: Exploiting a Viral Achilles' Heel, *Cell Host & Microbe* 3, January 2008, Elsevier Inc.
43. Jason G. Smith and Glen R. Nemerow, Mechanism of Adenovirus Neutralization by Human α -Defensins *Cell Host & Microbe* 3, 11–19, January 2008 Elsevier Inc.
44. Bastian A, Schäfer H. Human alpha-defensin 1 (HNP-1) inhibits adenoviral infection in vitro. *Regul Pept.* 2001 Sep 15;101(1-3):157-61.
45. Ishimoto H, Mukae H, Sakamoto N, et al: Different effects of telithromycin on MUC5AC production induced by human neutrophil peptide-1 or lipopolysaccharide in NCI-H292 cells compared with azithromycin and clarithromycin. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63:109-114.
46. Cole AM, Liao HL, Stuchlik O. Cationic Polypeptides are Required for Antibacterial Activity of Activity of Human Airway Fluid. *J Immunol*, 2002; 169 (12): 6985-91
47. Virella-Lowell I, Poirtier A, Chesnut KA. Inhibition of recombinant adeno-associated virus (rAAV) transduction by bronchial secretions from cystic fibrosis patients. *Gene Ther.* 2000; 7 (20): 1783-9.

ANEXO 1

FORMATO DE ASENTIMIENTO INFORMADO

“Detección de α -defensinas a nivel nasal en la infección respiratoria viral aguda”

México D. F. a ____ de _____ 201__

Niño(a): Te invitamos a participar en el estudio ***“Detección de α -defensinas a nivel nasal en la infección respiratoria viral aguda”***

Las infecciones respiratorias son la principal causa de que faltes a la escuela, muchas de estas son causadas por virus a los cuales llamaremos “bichos”. La meta de este estudio es encontrar nuevas sustancias que nos defienden de los bichos que causan las enfermedades de la nariz y la garganta.

¿Qué pasa si aceptas participar?

Para hacer el estudio te pedimos que nos des permiso de venir a visitarte y realizarte lo siguiente de manera común, no te distraerá de tus clases y trabajos en la escuela.

- a) Te aplicaremos un cuestionario con tus datos que incluyen tu nombre, tu casa y tu familia; así como un cuestionario diario de cómo te sientes.
- b) Toma de tu peso y talla.
- c) Revisión médica general; que incluye checar tus ojos, oídos, nariz, garganta, pulmones, corazón y abdomen.
- d) Toma de moco nasal con un pequeño tubito de plástico en la nariz que no lastima, solo cuando te encuentres enfermo de gripa.
- e) En el moco nasal se realizará la detección de bichos así como las sustancias que nos defienden de estos.

¿Qué riesgos están presentes?

No tiene riesgo para tu salud, la toma de moco se realiza mediante aspiración delicada con un tubito de plástico flexible, este procedimiento no duele, no pica, no molesta, solo puede causar estornudos y a veces muy rara vez, se puede poner roja tu nariz. Las personas que te hagan el cuestionario y que te saquen la muestra, saben hacerlo perfectamente.

¿Qué ganas con este estudio?

Lo que vas a ganar durante este estudio es recibir atención médica, conocer tu peso, talla y conocer, mediante pruebas de laboratorio, el bicho que cause tu gripa.

Este estudio ¿cuánto vale?

La atención médica y todos los estudios no tienen ningún costo, los detalles los comentaremos con tus papas.

¿Quién recibirá los resultados de este estudio?

Los resultados de la prueba de detección de los bichos se les darán a tus papás en cuanto salga el resultado.

Nombre y apellido del Testigo

Dr. Luis Manuel Terán Juárez
Investigador responsable
(Tel: 54871740)

Fecha _____

Fecha _____

Dra. Rocío Chapela Mendoza,
Presidente del comité de ética en investigación
Teléfono 54 87 17 00 ext. 5254.

ANEXO 2

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

“Detección de α -defensinas a nivel nasal en la infección respiratoria viral aguda”

México D. F. a ____ de _____ 201__

Señor (a):

Invitamos a su hijo a participar en el estudio ***“Detección de α -defensinas a nivel nasal en la infección respiratoria viral aguda”***

Las infecciones respiratorias agudas son la principal una causa de ausentismo escolar en los niños de México, hasta un 70% de estas infecciones son de origen viral. La meta de esta investigación será identificar nuevas sustancias que participan en la defensa de nuestras células contra los virus causantes de la enfermedad.

Este estudio se realizará según la Declaración de Helsinki, la cual asegura que su participación es **VOLUNTARIA y CONFIDENCIAL** y no alterará los cuidados médicos que podría necesitar.

¿Qué pasa si tomo la decisión de participar?

Para llevar a cabo el estudio le solicitamos a usted que nos autorice realizar a su hijo los siguientes procedimientos de una manera eventual o esporádica, es decir las distracciones escolares que sufrirá su hijo serán mínimas:

- f) Aplicación de un cuestionario relacionado con datos generales del alumno, de su hogar y de su familia; así como un cuestionario diario de datos clínicos respiratorios.
- g) Toma de peso y talla (somatometría);
- h) Revisión médica integral, que incluye detección de patologías respiratorias y otras patologías;
- i) Toma de muestra nasal en cada ocasión el niño presente síntomas de infección respiratoria alta. Se realizarán los siguientes estudios a las muestras nasales:
 - **DETECCION VIRAL:** Por medio de un estudio que se llama reacción en cadena de polimerasa, que se realizará a la secreción nasal de su hijo enfermo se detectará el virus causante del cuadro gripal.
 - **DETECCION DE α -DEFENSINAS:** Se buscara la presencia de estas sustancias que participan en nuestras defensas contra agentes infecciosos. Es la parte central del protocolo.

INDICACIONES PREVIAS AL ESTUDIO.

No existen indicaciones previas para el estudio. Nosotros nos encargaremos de detectar los datos que sugieran infección de vías respiratorias

¿Qué riesgos están presentes?

No existe ningún riesgo para la salud. La toma de muestra se realiza mediante succión suave con un capilar de silicón, no siendo agresiva para la mucosa nasal, y las cuales no tienen mayores complicaciones (estornudos y, de manera muy ocasional, irritación leve de la mucosa nasal). Las personas que aplicarán el cuestionario y que realizarán los procedimientos están debidamente capacitadas para hacerlo.

¿Existe un beneficio?

Los beneficios que obtendrá su hijo durante este proyecto serán: conocer su peso y talla, recibir atención médica oportuna, y conocer, mediante pruebas de laboratorio, el virus que cause su cuadro clínico. En caso de necesitar atención médica especializada se le canalizará al INER para recibirla. El examen médico y las pruebas de flujometría y de laboratorio NO tendrán ningún costo para usted; no obstante, lamentamos informarle que los costos de los medicamentos SÍ correrán por su cuenta.

Este ensayo tiene algún costo?

No tiene ningún costo, todos los estudios serán costeados por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias a través del servicio de Inmunología y Alergia y el laboratorio del instituto.

¿Quién recibirá los resultados de este ensayo?

Los resultados de la prueba de detección de virus se le darán a conocer en cuanto se cuente con el resultado.

Si tomo la decisión de empezar el estudio, ¿puedo cambiar de opinión?

Puede usted rechazar de participar en este estudio, darse de baja en cualquier momento sin justificarse y nadie podrá oponerse a su voluntad. No existe ninguna obligación de participar y tiene toda la libertad para rechazar cualquier prueba. Antes de firmar este consentimiento, haga usted las preguntas que le parecen necesarias al médico **alergólogo**, el cual está en la disposición para cualquier información adicional o aclaración relativa a dicho estudio.

La información que nos proporcione usted o su hijo(a) será utilizada con propósitos académicos y de investigación, su manejo será de carácter estrictamente confidencial; la información será utilizada exclusivamente por los investigadores del estudio, nadie más podrá conocerla.

La participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted o su hijo tienen la libertad de no contestar las preguntas que les incomoden o pueden retirarse del estudio en cualquier momento. Además, su decisión de participar o no en el estudio NO tendrá ninguna consecuencia NI limitará sus derechos a ser atendido(a) en servicios de salud, educación o en cualquier otro servicio público de cualquier programa social.

Como punto importante, hacemos de su conocimiento que el proyecto en el cual va a participar su hijo ha sido evaluado y aprobado por el comité de ética en investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

ANEXO 3

TÉCNICA MODIFICADA DE GREIFF Y GRUÉNBERG:

1. El lavado nasal se realizará utilizando una sonda Foley de 14 G, de silicón. La punta de la sonda se corta en la porción distal, manteniendo el balón intacto.
2. La punta de la sonda se introduce 1.5cm, teniendo cuidado de no lesionar el septum nasal.
3. Con el sujeto sentado, en posición de escritura, se infla el globo, y posteriormente se instilan

5ml de solución salina, por medio de una jeringa colocada en el extremo de la sonda Foley.

Se pide al paciente que trate de ocluir el espacio nasofaríngeo al elevar la porción posterior de la lengua y el paladar blando, evitando así que la solución instilada sea deglutida, y se deja la solución instilada 2 minutos en cavidad nasal. Posteriormente se extrae la mezcla de solución salina y moco con la misma jeringa.

4. Se instilan otros 5 ml de solución salina al 0.9%, y se repite el procedimiento previamente descrito. Se procede a desinflar el globo de la sonda Foley, y ulteriormente se retira la misma.
5. La muestra se guarda en tubos estériles de plástico (Falcon), y es enviada para su procesamiento.^{12,13}

Clin Exp Allergy 2001;31:1111-5

ANEXO 4

CUESTIONARIO DE DATOS CLÍNICOS

“Detección de α -defensinas a nivel nasal en la infección respiratoria viral aguda”

Folio |__|__|__|__|__|

1. Fecha: |__|__|__|__|__|__|

2. Nombre _____ 3. Dirección _____

4. Tel.: |__|__|__|__|__|__|

5. Fecha de nacimiento: |__|__|__|__|__|__|

6. Sexo: M F

7. Edad (años) |__|__|

8. Grupo |__|__|

9. Escuela |__|__|

10. Número de convivientes : |__|__|

11. Número de cuartos: |__|__|

56. Tu casa es húmeda () seca ()

57. De que material está hecha adobe () madera () ladrillos ()

58. Tiene techo de láminas de cartón (), láminas de asbesto (), concreto ()

59. El piso es de tierra (), concreto o mosaicos ()

60. Vives cerca de canales (lechos de agua) sí () a que distancia vives del canal __ mts.

no ()

61. Cuentas con todos los servicios básicos agua, drenaje y luz sí () no ()

62. ¿Tu comunidad cuenta con a) centro comunitario? sí () no ()

b) centro de salud? sí () no ()

62. En tu familia alguien trabaja en hospital o centro de salud? sí () no ()

63. En tu familia alguien trabaja en sitios públicos (cine, estadio, ventanillas de atención)

sí () no ()

63. En tu casa manejan cerdos, gallinas o patos? sí () no ()

64. Otros animales sí () no () cuáles? _____.

Esta vez que te enfermaste:

12. ¿Cuándo empezaste a estar enfermo? Fecha : |__|__|__|__|__|__|

Síntomas superiores

17. ¿Tienes la nariz inflamada o tapada? no (0) Poco (1) Bastante (2) Mucho (3)

26. ¿Te escurre moco de la nariz? N (0) P (1) B (2) M (3)

27. ¿De qué color? ... verde (1),amarillo (2),transparente (3)

25. ¿Estornudas... N (0) P (1) B (2) M (3)

19. ¿Te duele la garganta? N (0) P (1) B (2) M (3)

20. ¿Tienes la garganta.....normal (1)

...roja? (2)

...con puntos blancos (ulceraciones)? (3)

20. ¿Te escurren lágrimas? sí no

21. ¿Te sientes sordo? sí no

22. ¿Te huele mal.....la boca ? sí no

23.....la nariz? sí no

24. ¿Estás ronco? N (0) P (1) B (2) M (3)

28. ¿Has tenido dolor.....en la garganta? sí no

30.en los oídos? sí no

Síntomas inferiores

33. ¿Has tenidotos, sí () no ()

34. ¿Ha sido seca? (1)o tos con flemas? (2)

35. ¿La tos..... es en tosidos aislados? (1) o en accesos? (2)

36. ¿A que hora toses más? mañana (), tarde (), noche ().

37. La tos ha sido: (0 si no hay tos) leve (1), moderada (2), severa (3)

28. ¿Has tenido dolor..... en el cuerpo? sí no

31.en la cabeza o cara? sí no
32.en el pecho? sí no
37. ¿El pecho.....te hierve ? sí no
38.te silba ? sí no
38. Si te silba a que hora te silba más: mañana () tarde () noche ()
38. Apunte Ud. cuantas respiraciones tiene el niño por minuto _____ (normal 18/min)
39. ¿Respiras normal? (1) ...más rápido que de costumbre? (2)
40. ¿Te cuesta trabajo jalar aire? sí no
41. ¿A que hora te cuesta trabajo jalar aire? mañana __ tarde __ noche __

Otros datos

13. ¿Has sentido escalofríos? sí no
14. ¿Has tenido calentura? sí no, grados _____ ° C
16. ¿Te sientes cansado, sin ganas de jugar? sí no
17. ¿Se te han puesto morados los labios? sí no
42.las uñas? sí no
28. ¿Has tenido dolor muscular o de articulaciones?
31.en la cabeza o cara? sí no
43. ¿Cuántos días has estado o estuviste enfermo? _____ días
44. ¿Faltaste a la escuela? sí no. cuantos días? _____.
45. ¿Cuándo sanaste? Fecha de término : |__|__|__|__|__|__|
46. ¿Cuántas veces has tenido esta enfermedad en lo que va del año? _____ veces.

Factores de Riesgo

47. Padece tabaquismo: (1) no, (2) pasivo, (3) exfumador (3) fumador activo.
- Padece alguna enfermedad o condición especial : 1= sí, 2= no

- | | | | |
|---------------------------|-----|---------------------|-----|
| 48. Bronquitis | () | 56. Transplantes | () |
| 49. Asma | () | 57. Inmunesupresión | () |
| 50. Enfisema Pul. | () | 58. Embarazo | () |
| 51. Diabetes | () | | |
| 52. Hipertensión arterial | () | | |
| 53. Colesterol alto | () | | |
| 54. Enf. Corazón | () | | |
| 55. Enf. Renales | () | | |

Favor de **no contestar en campo:**

- | | | | |
|----------------------------|-----|---------------------------|-----|
| 59. Caso | | 60. Clasificación | () |
| clínicamente compatible | () | IRA inferior | (1) |
| Confirmado | () | IRA superior | (2) |
| Epidémicamente ligado | () | | |
| Confirmado por laboratorio | () | 61. Nivel de gravedad IRA | () |
| Probable | () | Leve | (1) |
| Sospechoso | () | Moderada | (2) |
| | | Severa | (3) |

Clasificación de la gravedad

1. Leve: con tos seca o productiva, obstrucción nasal, hiperemia faríngea, febrícula, respiración normal.
2. Moderada: con hiperemia faríngea, ulceraciones en las amígdalas u orofaringe, otalgia, hipertermia > 37.5 °C, respiración rápida.
3. Severa: con disociación toraco-abdominal, cianosis ungueal o labial, anorexia, astenia y adinamia.

ANEXO 5

AVISO DE CONFIDENCIALIDAD Y PRIVACIDAD DE LOS DATOS

1.- El servicio de Alergología e Inmunología clínica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, (INER) "Ismael Cosío Villegas" con domicilio Tlalpan N° 4502 colonia Sección XVI, Delegación Tlalpan, México Distrito Federal, , responsable de recabar, almacenar y administrar bajo su debida autorización (la cual para fines de investigación se acepta al proporcionarnos su datos) sus datos personales y/o sensibles y/o profesionales, tanto en lo selectivo, como en lo parcial y total, así pues del uso y protección de la misma el Demandante, el servicio de Alergología e inmunología clínica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) "Ismael Cosío Villegas" se compromete a dar lectura a este AVISO con la única finalidad de cumplir con lo dispuesto en el artículo 35 de la Ley de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental.

Los datos personales recabados en este estudio, tienen como finalidad que los datos personales y/o sensibles y/o profesionales, según sea el caso, recabados, puedan ser utilizados para la verificación de datos del paciente, esto es que sean correspondientes y fehacientes, que cuyos datos indique, así como su puesto e información relativa al estado del paciente.

Cualquier otro dato que sea necesario para la debida prestación de los servicios oferentes se solicitará en su debido momento.

En caso de no contar con dicha información el servicio de Alergología e Inmunología clínica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, se verá imposibilitado para iniciar, continuar, dar seguimiento al protocolo de investigación titulado "**Detección de α -Defensinas a nivel nasal en la infección respiratoria viral aguda**". Para las finalidades indicadas en el presente aviso de confidencialidad y privacidad, el servicio de Alergología e Inmunología clínica del INER puede recabar sus datos personales y/o sensibles y/o profesionales de la siguiente manera:

I.- Proporcionados directamente por el paciente al médico investigador

Sus datos personales y/o sensibles y/o profesionales pueden ser transferidos y tratados dentro y fuera del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", el lugar donde se captó y originó su almacenamiento y administración, por lo que su información puede ser compartida con asesores, operativos, administrativos, docentes y directivos del INER, si usted no manifiesta su oposición para que sus datos personales y/o sensibles y/o profesionales sean transferidos, se entenderá que ha otorgado su consentimiento para ello, almacenamiento, administración y utilización según sea el fin específico.

Nos reservamos el derecho de efectuar en cualquier momento modificaciones o actualizaciones al presente aviso de confidencialidad y privacidad, para la atención de novedades legislativas, jurisprudenciales, políticas internas o nuevos requerimientos solicitados por el servicio de Alergología e Inmunología Clínica del INER.

De igual forma, hacemos de su conocimiento que para cumplir con las finalidades previstas en este aviso y la Ley aplicable, serán recabados y tratados datos personales y/o sensibles y/o profesionales, los cuales se relacionan a su esfera más

íntima, tales como aspectos de origen racial o étnico, estado de salud, creencias religiosas, filosóficas y morales, opiniones políticas, entre otras.

Nos comprometemos a que los mismos serán tratados bajo medidas de seguridad y garantizando su confidencialidad y privacidad, objeto de este aviso.

En todo momento usted podrá revocar el consentimiento que nos ha otorgado para el tratamiento de sus datos personales y/o sensibles y/o profesionales, en su caso, a fin de que dejemos de hacer uso de los mismos. Para ello, es necesario que presente su petición por escrito, en el Servicio de Alergología e Inmunología clínica que cuenta con los siguientes datos:

Calzada de Tlalpan #4502

Col. Sección XVI

Delegación Tlalpan

México, Distrito Federal

C.P. 14080

Tel. 5487 1700

Horario de atención: Lunes a Viernes de 8:00 a 15:00 hrs.

Cumpliendo con lo dispuesto en los artículos 45 al 51 de la Ley de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental para los cuales se definen de la siguiente manera:

Artículo 45.- Las Unidades de Información Pública Gubernamental dispondrán de los medios necesarios para que las personas con legítimo interés estén en condiciones de ejercer la acción de protección de datos personales para asegurarse que:

I.- Los datos personales en posesión de la Autoridad siguen siendo necesarios para cumplir los fines para los que fueron requeridos. II.- Los datos personales no se utilicen o pongan a disposición del público o de terceros sin el previo consentimiento del interesado o su representante legal, con propósitos distintos e incompatibles con los fines originalmente señalados.

III.- Los datos personales hayan estado a disposición de la Autoridad por un período de tiempo superior al necesario.

Artículo 46.- Las Unidades de Información Pública Gubernamental deberán recibir y dar curso a todas las solicitudes de las personas que tengan por objeto la corrección sustitución rectificación guarda, supresión total o parcial de los datos personales. En contra de las respuestas negativas a las solicitudes realizadas en ejercicio de la acción de protección de datos personales procederán los recursos a que se refiere el título séptimo de la presente Ley.

Artículo 47.- No será necesario el consentimiento de las personas para difundir o entregar datos personales, cuando:

I.- La información sea necesaria para la prevención diagnóstico médico prestación de servicios médicos o la gestión de servicios de salud y no pueda recabarse el consentimiento de la persona por impedimentos legales o de salud;

II.- La información sea para fines estadísticos, científicos o de interés general previstos en la Ley siempre que los datos sean agregados y no puedan relacionarse con las personas a las que se refieran.

III.- La información sea requerida por orden judicial debidamente fundada y motiva.

IV.- Cuando el sujeto obligado contrate a terceros para la prestación de un servicio que requiera tratamiento de datos personales. Dichos terceros no podrán utilizar los datos personales para propósitos distintos a aquellos para los cuales se les hubieran transmitido. Incurriendo en responsabilidad civil o penal en caso de transgredir la privacidad, seguridad y patrimonio de las personas.

V.- Los demás casos que establezcan las Leyes.

Artículo 48.- Los trámites que se realicen en ejercicio de la acción de protección de datos personales serán gratuitos.

Artículo 49.- Los sujetos obligados por medio de las Unidades de Información Pública Gubernamental que posean datos personales deberán informarlo al instituto del mismo modo y periódicamente deberán informarle acerca de la actualización de los sistemas de archivo de los datos personales en su poder. Además, deberán tomar las medidas técnicas para proteger los archivos y sistemas de archivo que resguarden datos personales, contra los riesgos naturales, la pérdida por siniestro o accidentes y contra el riesgo de que se acceda a ellos sin autorización, se utilicen de manera encubierta o se contaminen por virus informático.

Artículo 50.- Las personas con interés legítimo o sus representantes legales, previa identificación podrán solicitar los datos personales. La Autoridad tendrá un plazo de diez días hábiles contados a partir del siguiente día de recibida la solicitud para responder si tienen o no la información solicitada; la Autoridad deberá entregar la información en un plazo no mayor de cinco días hábiles contados a partir de la fecha del oficio de respuesta.

Artículo 51.- Las personas interesadas o sus representantes legales previa identificación podrán solicitar ante la Unidad de Información Pública Gubernamental que corresponda que se modifiquen los datos personales que se encuentren en los archivos del sujeto obligado requerido.

Para que proceda la solicitud el interesado deberá precisar las modificaciones que deben realizarse y aportar, en su caso, la documentación que sustente su petición, cuando así se requiera en razón del tipo de modificación. La autoridad tendrá un plazo de quince días hábiles desde la presentación de la solicitud para realizar las modificaciones o demostrar las razones fundadas y motivadas, por las que no procedieron las modificaciones solicitadas.

En ambos casos, deberá notificarlo al interesado en un plazo no mayor de diez días hábiles y ante la negativa de la Autoridad a realizar la modificación, se podrán interponer los recursos establecidos en el título séptimo de esta Ley.

ANEXO 6

Uso de las columnas Amicón Ultra-0.5

(Columnas para concentrar)

1. Insertar la columna en un micro-tubo estéril para micro-centrifugar.
2. Añadir 500 µl de la muestra a la columna y tapar el tubo
3. Centrifugar el tubo con la tapa hacia el centro del rotor durante 30 min
4. Sacar el filtro del micro-tubo
5. Para evitar la pérdida de muestra, inmediatamente después, colocar el filtro al revés en el micro-tubo limpio.
6. Colocar en la centrífuga con la tapa abierta hacia el centro del rotor, centrifugar a 1000 g durante 2 min.
7. Para la óptima recuperación, realizar el spin reverso durante 2 minutos.

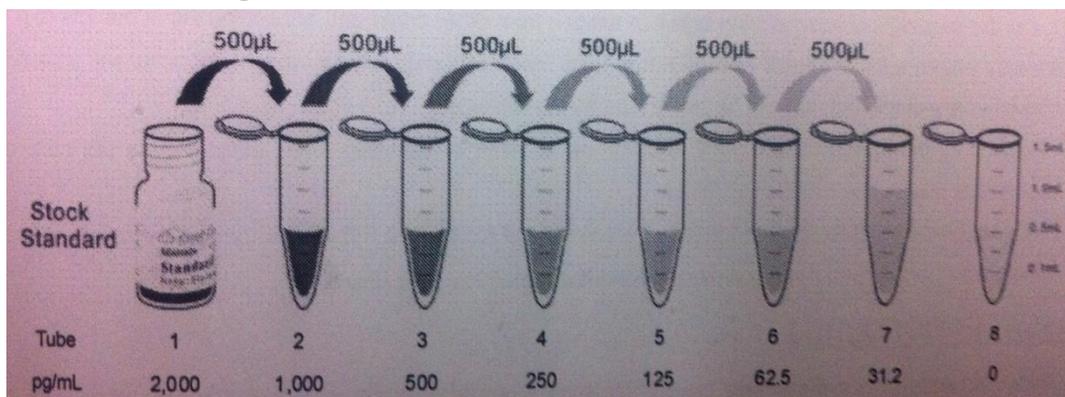
Nota.- Para desalar o intercambiar buffer o solvente se puede sustituir el mismo volumen de la muestra (500 µl) por cualquier solvente realizar el proceso, se puede repetir varias veces hasta que la concentración sea la deseada.

ANEXO 7

ELISA para α -Defensina 1, 3

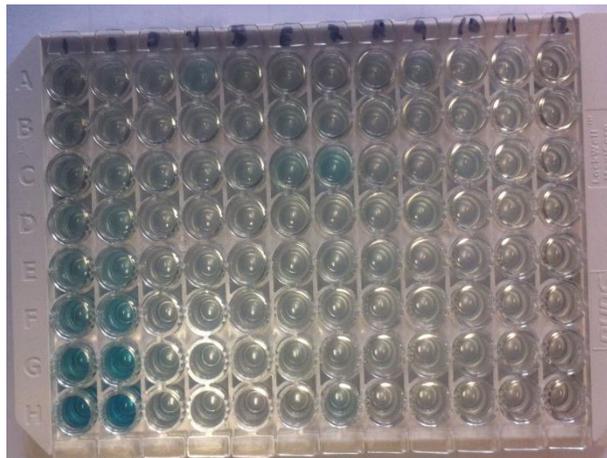
La placa de microtitulación en este equipo han sido precubiertos con un anticuerpo específico de α -Defensina 1. Estándares de muestras se le añadieron a los pocillos de las placas de microtitulación adecuadas con un anticuerpo conjugado con biotina específica para α -Defensina 1. A continuación, se añadió Avidin conjugado con peroxidasa Horseradish a cada pocillo de las microplacas, y se incubó. Después de añadir solución de sustrato tetrametilbencidina, sólo los pozos que contienen α -Defensina 1, anticuerpo conjugado con biotina y la enzima conjugada avidina, exhibirán un cambio de color. La reacción enzima-sustrato se termina mediante la adición de ácido sulfúrico y el cambio de color se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm + - 10 nm. La concentración de α -Defensina 1 en las muestras se determina entonces mediante la comparación de O.D. con la curva estándar.

1. Determinar la estandarización de la muestra en pozos diluidos, el objetivo y la muestra. Preparar 7 diluciones para identificar el estándar, e incluir el objetivo. Añadir 100 μ l de cada una de las diluciones de la normal, el objetivo y las muestras en los pocillos correspondientes. Cubrir la placa con el sellador. Incubar durante 2 horas a 37°C. Figura 4

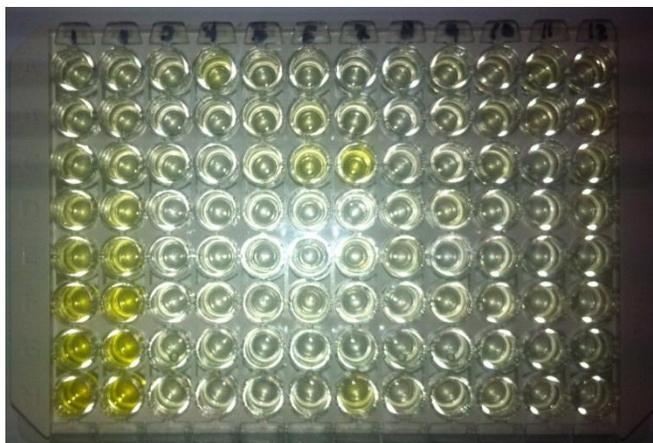


2. Retire el líquido de cada pocillo, no se lava.

3. Añadir 100 μ l del **reactivo de detección A** a la solución de trabajo a cada pocillo. Incubar durante 1 hora a 37° C después cubrir con el sellador de placas.
4. Aspirar la solución, lavar con 350 μ l de 1^x solución de lavado a cada pocillo utilizando una jeringa, pipeta multicanal, dispensador múltiple o autowasher y dejar que repose durante 1-2 minutos. Retire el líquido restante de todos los pocillos por completo mediante el ajuste de la placa sobre papel absorbente. Lavar totalmente en 3 ocasiones. Después del último lavado, eliminar los restos de líquido, por aspiración o decantación. Invierta la placa sobre papel absorbente.
5. Añadir 100 μ l de solución de trabajo, **reactivo de detección B** a cada pocillo. Incubar durante 30 minutos a 37°C después de cubrirla con sellador de placa.
6. Repita el proceso de aspiración/lavado en un total de 5 ocasiones como en el paso 4.
7. Incubar durante 15-25 minutos a 37°C (no sobrepasar los 30 minutos). Proteger de la luz El líquido se volverá azul mediante la adición de solución de sustrato. Figura 5.



8. Añadir 50 μ l de solución de STOP a cada pocillo. El líquido se volverá amarillo por la adición del líquido de STOP. Mezcle el líquido por golpes en los bordes de la placa. Si el color cambió, no aparece uniforme, golpee suavemente la placa para asegurar una adecuada mezcla. Fig. 6



9. Retire cualquier gota de agua y las huellas digitales en la parte inferior de la placa, confirmar que no exista burbujas en la superficie del líquido.
10. A continuación, ejecute la microplaca lector y medición de la conductancia a 450 nm inmediatamente.

ANEXO 8

KIT IFA PANEL PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACION DE VIRUS RESPIRATORIOS (LIGHT DIAGNOSTICS)

Preparación del reactivo:

Disolución de PBS/Tween 20

1. Disolver el contenido del paquete de PBS en 950 ml de agua desionizada.
2. Agregar el contenido de Tween 20/ azida sódica 100X (10 ml) al PBS y mezclar bien.
3. Añadir agua destilada a la mezcla, hasta obtener 1 litro. Transferir a un envase, limpio y etiquetado, para su almacenamiento y cerrarlo bien
4. Con el lado de las células hacia abajo sobre un portaobjetos de vidrio con liquido de preparación.
5. Seque el exceso de líquido de los objetos del portaobjetos.
6. Examine los portaobjetos, con un microscopio de fluorescencia a 100-200x, en busca de células que presenten fluorescencia. Puede realizarse un examen detallado a 400x.

Interpretación de resultados

El patrón de la tinción dependerá del virus causante de la infección y refleja el patrón de crecimiento del virus. Los patrones de tinción típicos observados con los virus respiratorios:

- Virus sincitial respiratorio
La fluorescencia se localiza en el citoplasma y se asocia a los sincitios, la tinción citoplasmica es punteada con inclusiones pequeñas.
- Influenza A y B
La fluorescencia es nuclear, citoplásmica o ambas. La tinción nuclear es uniformemente brillante. La tinción citoplásmica a menudo punteada, con inclusiones grandes.
- Tipos 1, 2 y 3 del virus Parainfluenza
LA fluorescencia está confinada al citoplasma, la tinción citoplásmica es punteada, con inclusiones irregulares.

Procedimiento de tinción para inmunofluorescente indirecto sugerido:

1. Permita que los portaobjetos de testigo fijados en acetona, la muestra y los reactivos alcancen la temperatura ambiente.
2. Agregar suficiente Respiratory Virus Screen 50007 o anticuerpo específico de identificación o anticuerpo normal de ratón (reactivo de testigo negativo) para cubrir las células; 1 gota para las manchas celulares y 4 a 6 gotas para los Shell vials.
3. Incube el portaobjetos a 37°C durante 30 min en una cámara húmeda.
4. Enjuague el portaobjetos suavemente con una piseta de PBS/Tween 20 disolución durante 10 a 15 segundos para eliminar el exceso de solución de anticuerpo monoclonal, tenga cuidado de dirigir el chorro lejos de pocillo. Para Shell vials; aspire el reactivo del frasco y lave suavemente cada Shell vial 3 veces con 1 mL de PBS/Tween 20 disolución.
5. Coloque el portaobjetos en una placa de tinción o en un recipiente de Coplin (con cestillo para portaobjetos o equivalente) y cubra con PBS. Enjuague 2 a 3 veces durante 5 a 10 minutos. Agite suavemente con un agitador magnético o manualmente.
6. Sacuda el exceso PBS/Tween 20 disolución del portaobjetos y seque cuidadosamente el área que rodea la mancha de células.
7. Agregue suficiente FITC-labeled anti-mouse IgG Conjugate 5008 o equivalente para cubrir las células; 1 gota para manchas de células y 4 a 6 gotas para Shell vials.
8. Repita los pasos 3 a 6.
9. Prepare bajo un cubreobjetos con Mounting Medium acuoso pH 8.5 5013 o equivalente. Para Shell vials: aspire el PBS/Tween de los Shell vials. Levante cada cubreobjetos con una aguja doblada fijada a una jeringa pequeña y sáquelo cuidadosamente con pinzas. Prepare cada cubreobjetos