



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN
INDUCIBLE EN HIPOXIA 1 EN CÉLULAS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON
ASMA: IMPLICACIONES CLÍNICAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

JOSÉ IGNACIO GRANADOS NAMBO

ASESOR: DRA. SARA HUERTA YEPEZ

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo Tesis

Evaluación de la expresión del factor de transcripción inducible en hipoxia 1 alpha (HIF-1) en células de pacientes pediátricos con asma: implicaciones clínicas

Que presenta el pasante: José Ignacio Granados Nambo
Con número de cuenta: 099575238 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de Octubre de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Andrés Romero Rojas	
VOCAL	Dr. Víctor Manuel Zendjeas Buitrón	
SECRETARIO	Dra. Sara Huerta Yepez	
1er. SUPLENTE	MVZ. Angel Germán Martínez Sosa	
2do. SUPLENTE	QFB. Ma. de Lourdes Galván Ruiz	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/iac

Este trabajo fue realizado en:

- Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México, Federico Gómez.
- Departamento de Alergia e Inmunología del Hospital Infantil de México, Federico Gómez.
- Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS
- El proyecto fue financiado por Fondos Federales (No. proyecto HIM/2011/020).

ÍNDICE GENERAL

1. Abreviaturas.....	6
2. Resumen.....	7
3. Marco Teórico	9
3.1 Asma alérgica	
3.2 Fisiopatología	
3.3 Historia natural de la remodelación de las vías respiratorias	
3.4 Alteraciones epiteliales	
3.5 Secreción de moco y células caliciformes	
3.6 Fibrosis subepitelial	
3.7 Aumento de la masa muscular lisa	
3.8 Angiogénesis	
4. Antecedentes.....	18
5. Planteamiento del problema.....	21
6. Justificación.....	21
7. Objetivos.....	22
7.1 General	
7.2 Específicos	
8. Hipótesis.....	23
9. Material y Métodos.....	24
9.1 Diseño del estudio	
9.2 Definición del universo de casos	
9.3 Selección de pacientes	
9.4 Tamaño de muestra	
9.5 Estadística descriptiva	
9.6 Estadística analítica o Inferencial	

9.7 Operacionalización	
9.8 Muestras clínicas	
9.9 Purificación de células de sangre periférica y preparación de laminillas	
9.10 Ensayo de inmunocitoquímica	
9.11 Citometría de flujo	
9.12 Análisis Estadístico	
10. Resultados.....	30
10.1 Datos clínicos de la población de estudio	
10.2 La expresión de HIF-1 α se ve aumentada en pacientes pediátricos con asma.	
10.3 Los linfocitos B y macrófagos son las principales células mononucleares que expresan HIF-1 α .	
11. Discusión.....	36
12. Conclusiones.....	39
13. Referencias.....	40
14. Anexo: Carta de consentimiento.....	42

INDICE DE TABLAS

- **Tabla 1.** Algunos factores que promueven el desarrollo del asma.....9
- **Tabla 2.** Clasificación del asma.....10

ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1.** Respuesta asmática.....11
- **Figura 2.** Desarrollo de angiogénesis.....12
- **Figura 3.** Estructura de HIF-1 α16
- **Figura 4.** Regulación de HIF-1 α17
- **Figura 5.** Micrografías representativas de la tinción de inmunocitoquímica para las proteínas HIF-1 α , VEGF, CXCL12 y CCL2.....19
- **Figura 6.** Características clínicas de pacientes y sujetos control.....32
- **Figura 7.** Micrografías representativas de la expresión de HIF-1 α33
- **Figura 8.** Porcentaje de la expresión de HIF-1 α34
- **Figura 9.** Expresión de HIF-1 α por citometría de flujo.....35

1. ABREVIATURAS

OVA	Ovoalbúmina de huevo
ALUM	Hidróxido de aluminio
HIF-1	Factor Inducible en hipoxia
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
2ME2	2-Metoxiestradiol
EDHB	Ethyl-3,4 dihydroxybenzoate
SFB	Suero fetal bovino
HE	Hematoxilina y eosina
PBS	Solución buffer de fosfatos
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
FEV	Volumen espiratorio máximo
COX	Ciclooxigenasa
HER	Elementos de respuesta a hipoxia

2. RESUMEN

Introducción: El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas, que afecta a 300 millones de personas a nivel mundial, en México se ha reportado que la prevalencia en niños de entre 6-7 años es de 8.6% en tanto que en los niños de 13-14 años la prevalencia tiene una variación de 6.6 a 11.6%. La población que se ve afectada por este padecimiento tiene una mala calidad de vida y generan altos costos por atención en los servicios de salud, por lo que continua siendo un problema de salud, ya que al momento los tratamientos existentes para este padecimiento son solo paliativos, por lo que es necesario entender mejor la fisiopatogenia del esta enfermedad para lograr nuevos y mejores tratamientos. Recientemente nuestro grupo de trabajo reportó que el factor de transcripción inducible en hipoxia (HIF-1), juega un papel central en la fisiopatogénesis de la inflamación alérgica pulmonar en un modelo murino. Además que existen niveles elevados de este factor de transcripción en pacientes asmáticos adultos después de recibir un reto alérgico, el aumento de HIF-1 α correlacionó con niveles de VEGF evaluado por ELISA en líquido de lavado bronqueoalveolar de estos mismos pacientes. Sin embargo, no se había evaluado la expresión de HIF-1 α en pacientes asmáticos en edad pediátrica.

Objetivo: Evaluar la expresión de HIF-1 α en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con asma crónica, asma aguda e individuos control.

Material y métodos. Se reclutaron 75 pacientes con asma alérgica, 50 con asma crónica controlada, 25 con crisis asmática (asma aguda) y 35 sujetos sanos. Se colectaron 3mL de sangre periférica y mediante la técnica de gradientes de densidad fueron purificadas las células mononucleares. Posteriormente, con estas células se prepararon laminillas en donde se realizó la evaluación de la expresión de HIF-1 α mediante inmunocitoquímica. Los resultados de las inmunotinciones fueron corroborados mediante citometría de flujo multiparamétrica, en donde también se identificó cual es el tipo de célula que mayormente está expresando esta proteína. Con los resultados obtenidos se realizó estadística descriptiva obteniendo medidas de tendencia central como la media, desviación estándar, error estándar, frecuencia e Intervalos de Confianza 95% (IC95%). Se analizó por ANOVA corregido Post HOCK para análisis de tres grupos (asma crónica, asma aguda y sujetos sanos).

Resultados: La expresión de HIF-1 α se encontró aumentada en las muestras de pacientes con asma en comparación con controles sanos. La expresión HIF-1 α es mayor en pacientes que cursan con asma aguda en comparación con los que presentan asma crónica. Los resultados de

la citometría de flujo demostraron que la expresión de HIF-1 α primordialmente se observa en macrófagos y linfocitos B.

Conclusiones: Por primera vez se reporta que HIF-1 α se encuentra aumentado en pacientes pediátricos con asma alérgica comparado con controles sanos, sobre todo en la etapa aguda de la enfermedad. Por lo que proponemos que HIF-1 α puede ser un marcador pronóstico y/o blanco terapéutico en esta enfermedad.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 El asma alérgica

El asma es una de las enfermedades crónicas más prevalentes en todo el mundo, se estima que 300 millones de personas en todo el mundo sufren de asma, con 250.000 muertes anuales atribuidas a la enfermedad. Se estima que el número de personas con asma crecerá en más de 100 millones para el 2025 [1].

El asma es una inflamación crónica de las vías aéreas inferiores, asociada con hiperreactividad de la vía aérea que lleva a episodios de sibilancias, disnea, opresión torácica y tos; estos síntomas particularmente en la noche o en la mañana. Los episodios usualmente asociados a obstrucción de la vía aérea reversible, ya sea espontáneamente o con tratamiento [2]. Con características como atopía, que es manifestada como la presencia de pruebas cutáneas positivas, o la respuesta clínica a los alérgenos ambientales. Hiperreactividad es la tendencia de las vías aéreas inferiores a estrechar su diámetro de forma excesiva en respuesta a disparadores, que tienen ninguna o poca respuesta en individuos sanos [2]

De acuerdo a datos de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud en México, en el 2012 se reportó un total de 317,783 de casos de asma y estado asmático, lo cual traduce una tasa de incidencia de 290.96 casos por cada 100,000 habitantes, de los cuales más de la mitad de los casos anuales reportados de asma se presentan en población pediátrica [3].

Hay factores que influyen en el desarrollo y la expresión del Asma [2]:

Factores del Huésped	Factores ambientales
<ul style="list-style-type: none">• Genética (genes que predisponen a la atopía, genes que predisponen a la hiperreactividad aéreas de las vías)• Obesidad• Sexo	<ul style="list-style-type: none">• Alérgenos: intradomiciliarios: ácaros del polvo doméstico, caspa de animales, alérgeno de la cucaracha, hongos, entre otros.• Infecciones: predominantemente virales (hipótesis de la higiene)• Sensibilizadores ocupacionales• Humo de tabaco: activo y pasivo• Contaminación del aire• Dieta

Tabla 1. Algunos factores que promueven el desarrollo del asma.

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

3.1.2 Clasificación

Se puede clasificar según su gravedad a la presentación (GINA 2004, NAEPP: National Asthma Education and Prevention Program), según su control (GINA: Global Initiative for Asthma, NAEPP), por grupo etéreo [2].

	INTERMITENTE	LEVE PERSISTENTE	MODERADA PERSISTENTE	GRAVE PERSISTENTE
Síntomas	Menos de una vez a la semana	Más de una vez a la Semana pero menos De una vez al día	Diarios	Se presentan diario
exacerbaciones	Cortas	Pueden afectar actividad diaria y el sueño	Pueden afectar actividad y sueño	Frecuentes y limita actividades físicas
Síntomas nocturnos	No más de dos veces al mes	Más de dos veces al mes	Más de una vez a la semana, es necesario el uso diario de β_2 de acción corta	Frecuentes
FEV1 o FEP	$\geq 80\%$ del predicho	$\geq 80\%$ del predicho	60-80 % predicho	$\leq 60\%$ predicho
FEP o FEV1	Variabilidad <20%	Variabilidad <20-30%	Variabilidad >30%	Variabilidad >30%

Tabla 2. Clasificación del asma.

3.2 Fisiopatología

La alergia es una enfermedad multifactorial [4, 5] en la que pueden participar aspectos como la dieta materno-infantil, la contaminación ambiental, infecciones respiratorias y cambios de temperatura entre otros [1] sin embargo la predisposición genética o atopía es el aspecto más importante para el desarrollo de la enfermedad. Por lo que los individuos susceptibles, al estar expuestos a los alérgenos montan una hipersensibilidad mediada por IgE [6] generando una respuesta inflamatoria de tipo Th2 en la que existe producción de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13. Además existe activación de mastocitos, eosinófilos y basófilos, provocando la liberación de mediadores inflamatorios como son las prostaglandinas, leucotrienos, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ y quimiocinas como CCL2, CCL5, CCL11 y CXCL12 entre otras [7].

Las quimiocinas son las responsables de la quimiotaxis de más células inflamatorias como, linfocitos Th2 (CD4), macrófagos, neutrófilos y en especial de eosinófilos que son los mediadores de la inflamación alérgica [8]. Además promueven la angiogénesis y la proliferación y diferenciación de fibroblastos que secretan colágeno causando cambios estructurales característicos de la remodelación pulmonar [2].

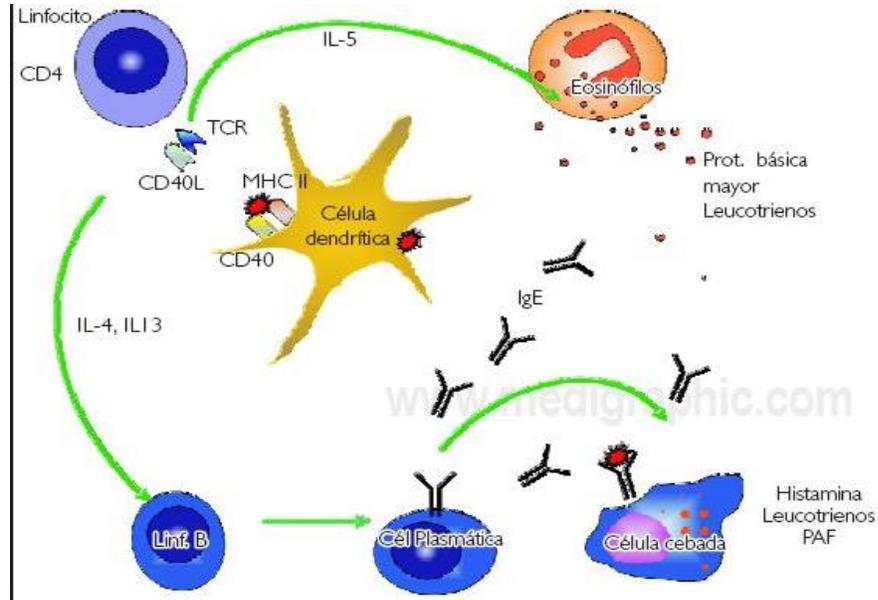


Figura 1. Respuesta asmática

La angiogénesis es uno de los principales componentes de la inflamación crónica bronquial y tiene un papel importante en la progresión de la enfermedad [2]. En pacientes asmáticos se ha observado que la mucosa bronquial es más vascularizada, presentando mayor número de vasos e incremento en su calibre. Además de que se ha reportado que existen altos niveles del factor de crecimiento del endotelio vascular “Vascular endotelial growth factor” (VEGF) [9] el cual es el principal regulador de la angiogénesis [10].

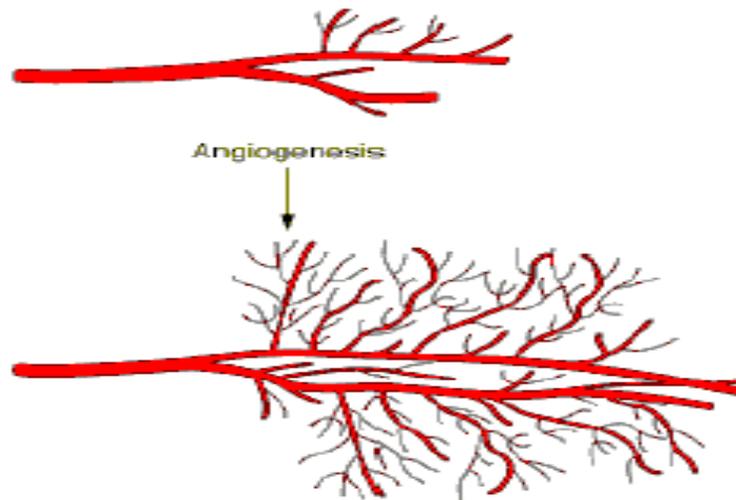


Figura2.Desarrollo de angiogénesis.

Los estudios histopatológicos demuestran variaciones estructurales en la vía aérea de los pacientes afectados en comparación con sujetos sanos, lo cual se denomina remodelación de la vía aérea, la cual abarca alteraciones estructurales en las células y tejidos, esto fue descrito por primera vez hace más de 85 años [11] en su descripción clásica del asma fatal.

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

3.3 Historia natural de la remodelación de las vías respiratorias

Varios estudios han demostrado que los pacientes asmáticos experimentan una disminución acelerada de la función pulmonar más que los sujetos sanos y que es proporcional con la duración y la gravedad de su enfermedad. Otros estudios han informado de que los niños asmáticos tienen función pulmonar deficiente, lo que sugiere que la remodelación podría comenzar tempranamente en el curso de la enfermedad, sin embargo el inicio de la remodelación de las vías respiratorias en pacientes asmáticos no está aún bien caracterizado. Los datos del Programa de Manejo del Asma Infantil (Childhood Asthma Management Program) mostraron un descenso acelerado en las pruebas de funcionamiento pulmonar entre las edades de 5 y 18 años en niños con asma leve a moderada [4, 12-15].

3.4 Remodelación y las intervenciones terapéuticas.

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

Debido a su efecto sobre la modulación inflamatoria asmática de las vías respiratorias, se pensó que los corticosteroides inhalados tenían un gran potencial para influir en remodelación de las vías respiratorias. Sin embargo, los datos disponibles hasta la fecha son más bien contradictorios y no concluyentes. Por otra parte, los estudios funcionales no han podido demostrar un efecto sustancial de los corticosteroides inhalados en la inhibición de la disminución de la función pulmonar en pacientes con asma [16].

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

Aún se necesita saber cómo cada una de estas características de la remodelación de la vía aérea contribuye a los síntomas anormales, la fisiología y la historia natural del asma. También se necesitan más investigaciones para determinar los tipos de intervenciones capaces de alterar las diversas características de la remodelación de las vías respiratorias y el efecto de estas intervenciones sobre las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Por otra parte, es importante desarrollar mejores herramientas no invasivas y biomarcadores específicos que ayudarán a determinar con precisión las diferentes subpoblaciones de pacientes asmáticos. Haciendo hincapié en que las investigaciones deben ser dirigidas a los factores genéticos

asociados a los diferentes tipos y grados de remodelación tisular y la traducción funcional de estas modificaciones genéticas. Estos y otros estudios pueden ayudar a la comprensión de la patogénesis del asma y pueden dar algunas estrategias para controlar efectivamente la progresión del asma [17].

3.5 Alteraciones epiteliales

Los cambios morfológicos en el epitelio de las vías respiratorias son una característica clave de la remodelación de las vías respiratorias en pacientes asmáticos. Las alteraciones epiteliales en pacientes asmáticos incluyen desprendimiento del epitelio, la pérdida de las células ciliadas, hiperplasia de células caliciformes y la regulación al alza de los factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas. Muchos informes han también sugerido que la función de barrera del epitelio de las vías respiratorias en pacientes asmáticos es disfuncional, exhibiendo una ruptura de la integridad epitelial a lo largo de la unión estrecha con la reparación del deterioro después de la lesión, sin embargo, es importante señalar que los cambios epiteliales no son un rasgo característico sólo de asma y puede ser observado en pacientes con diversas condiciones patológicas de los pulmones [16].

3.6 Secreción de moco y las células caliciformes

La hipersecreción de moco de las mucinas MUC5AC y MUC5B por las células caliciformes es una característica fisiopatológica de la remodelación de las vías respiratorias en pacientes con asma. Se ha demostrado que las citocinas TH2 (predominantemente IL- 9 e IL- 13), así como de IL- 1 β , TNF- α , y la ciclooxygenasa-2 (COX- 2) y sus vías de señalización intracelulares asociadas, están implicadas en la regulación al alza de la síntesis de mucina y el desarrollo de hiperplasia de células caliciformes [16].

3.7 Fibrosis subepitelial

Los fibroblastos son las células estrelladas grandes y planas que se encuentran en estrecha proximidad con el epitelio basal. En un ambiente inflamatorio tal como las vías respiratorias asmáticas, los fibroblastos se activan y se diferencian en miofibroblastos, que secretan las proteínas de los mediadores proinflamatorios y de la matriz extracelular, incluyendo colágena I, III y V y fibronectina. El compartimiento de la matriz extracelular de la pared de la vía respiratoria es dinámico, lo que refleja el saldo neto de la síntesis y la degradación que está regulado por la acción de las metaloproteinasas de la matriz y por inhibidores de metaloproteinasas. Sin embargo, un cambio en este equilibrio hacia el aumento de la matriz da

como resultado fibrosis, lo que lleva a la alteración de la estructura y a las propiedades mecánicas anormales. En los pacientes asmáticos la susceptibilidad a lesión y la respuesta de reparación aberrante dan como resultado la activación persistente de los fibroblastos, lo que lleva a la fibrosis subepitelial [16].

3.8 El aumento de la masa muscular lisa

Las células musculares constituyen las principales células estructurales dentro de los bronquios, y su incremento es la causa principal de obstrucción de vías aéreas. En las vías respiratorias asmáticas la masa muscular aumenta significativamente a causa de la proliferación de células por hiperplasia y por el tamaño de las células, hipertrofia. Además de los cambios estructurales, las células de músculo liso participan en el proceso inflamatorio y de remodelación a través de la expresión de moléculas de adhesión celular, receptores de citoquinas, quimiocinas (RANTES, eotaxina, proteína inflamatoria de macrófagos 1a, y la IL- 8) y por activación de receptores Toll-like. La expresión en la superficie de las moléculas de adhesión por las células de músculo liso podría ser crucial en la regulación de las interacciones de una gran variedad de células inflamatorias [16].

3.9 Angiogénesis

Fisiológicamente existe una red de capilares sistémicos que rodean la vía aérea desde sus porciones centrales hasta los bronquiolos. Los capilares subepiteliales traqueobronquiales convergen en plexos más profundos con los capilares pulmonares drenados por las venas pulmonares. Las células endoteliales de la vasculatura pulmonar regulan la selectividad y especificidad del infiltrado celular en la vía aérea [16].

La angiogénesis es un proceso que se define como el crecimiento y proliferación de vasos sanguíneos de neoformación (fig. 2), y en conjunto con la vasodilatación y edema de la pared son componentes reconocidos de los casos leves, moderados y fatales de asma, contribuyendo de forma importante al edema y rigidez de la vía aérea en estos casos [16].

Se ha demostrado tanto en adultos como en niños que la vía aérea de pacientes con asma moderada es más vascularizada y tiene un número mayor de vasos por milímetro cuadrado de submucosa y que la vasculatura es de mayores dimensiones que en los pacientes no asmáticos sanos. Estos cambios estructurales, aunados al edema de estas nuevas estructuras vasculares, contribuyen a un diámetro luminal disminuido en la vía aérea [16].

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la angiopoyetina-1 (Ang-1) y Angiopoyetina- 2 (Ang-2) son factores de crecimiento celular claramente implicados en la remodelación vascular de la vía aérea, y asimismo se ha asociado a otros factores de crecimiento no específicos [16]. El VEGF es encontrado en las células del epitelio bronquial, células mononucleares y linfocitos T. Este factor ha mostrado múltiples funciones reguladoras de la angiogénesis, entre ellas estimulación de la proliferación endotelial, de la formación de vasos sanguíneos y supervivencia de las células endoteliales, y se ha mostrado su expresión ante estímulos tales como el estrés mecánico y la hipoxia por medio del factor inducible en hipoxia (HIF-1). De hecho, el VEGF actúa al incrementar la permeabilidad de estos vasos sanguíneos anormales, resultado de la dilatación y el edema, que contribuyen al estrechamiento de las vías respiratorias. Además de proporcionar la nutrición a las vías respiratorias, estos vasos son la fuente de las células inflamatorias y de sus mediadores inflamatorios [16].

Se han encontrado niveles elevados de VEGF y Ang-1 en el esputo y la submucosa bronquial de pacientes asmáticos adultos. En la submucosa el incremento de VEGF, identificado por inmunohistoquímica, se ha asociado de forma directamente proporcional con el área vascular y de forma inversamente proporcional con el calibre de la vía aérea [16]. En el 2006 el grupo de Kim y colaboradores publicaron por primera vez que existían altos niveles del factor de transcripción inducible en hipoxia (HIF), HIF-1 α y HIF-2 α en biopsias de 30 pacientes asmáticos en comparación con los controles y este incremento correlaciona con los niveles de VEGF en suero [2, 11].

HIF-1 es un factor de transcripción que fue descrito en 1991 por el grupo de Semenza al identificarse la eritropoyetina (EPO) responsable de la eritropoyesis como el primer gene regulado por HIF-1 y con ello reportaron la secuencia consenso de unión al DNA descrita como los elementos respondedores a hipoxia (HRE) 5'-(A/G)CGTG-3' [3, 9].

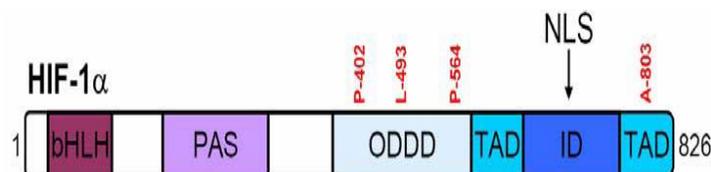


Figura 3. Estructura de HIF-1 α

Hasta la fecha se ha reportado que regula la transcripción de más de 150 genes involucrados en procesos tan diversos como angiogénesis, eritropoyesis, metabolismo energético, glicólisis, apoptosis, crecimiento celular, sobrevivencia y movilidad celular. Este factor es el principal regulador de la homeostasis del oxígeno y hasta hace unos años se creía que se regulaba solo en procesos de hipoxia (Rothenberg ME). Sin embargo en los últimos años se han generado evidencias de que HIF-1 es regulado en procesos de inflamación.

HIF-1 es un heterodímero constituido por dos subunidades, la subunidad α es inducible [18] y la subunidad β previamente identificada como ARNT (Aryl hidrocarbon receptor translocator) la cual es constitutiva [19]. HIF-1 α al ser fosforilada transloca al núcleo [20] donde dimeriza con β para unirse a los HER, dándose la transcripción de sus genes blanco [21]. Este factor de transcripción ha sido ampliamente estudiado en diversos padecimientos en los que existe hipoxia como hipertensión pulmonar, infartos y principalmente en cáncer, en los que ha sido un blanco terapéutico y recientemente en artritis reumatoide una enfermedad esencialmente inflamatoria. Sin embargo, existen pocos reportes de la participación de HIF-1 en asma.

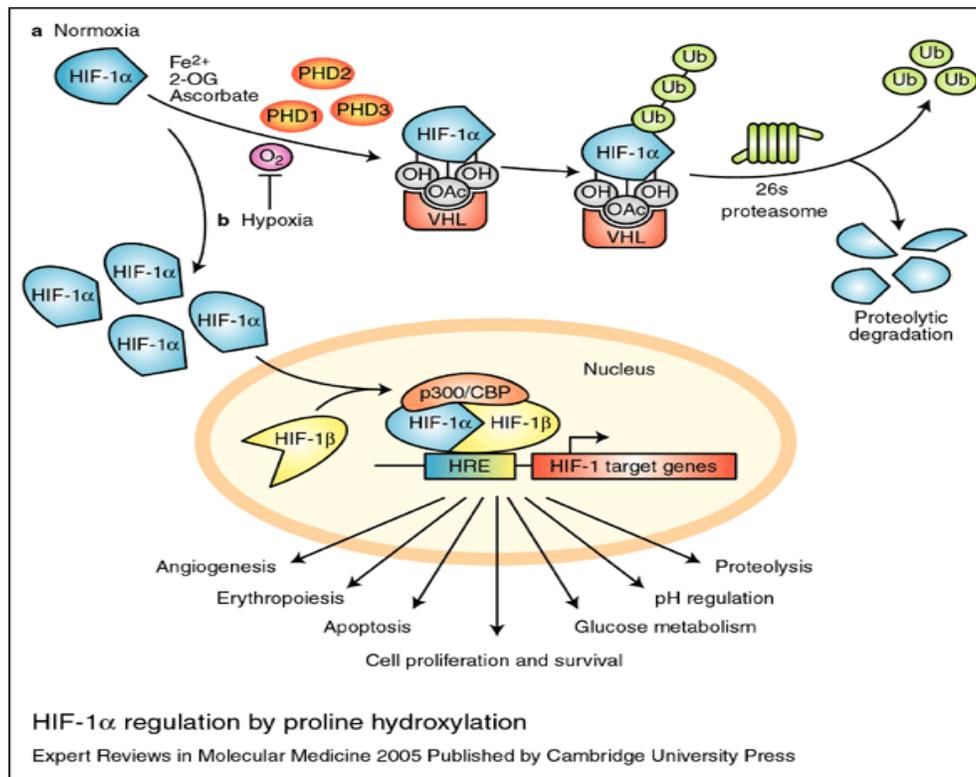


Figura 4. Regulación de HIF-1 α .

4. ANTECEDENTES

En nuestro grupo de trabajo hemos estudiado en un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar la expresión de HIF-1 α y su correlación con la expresión de quimiocinas que participan en el asma y presentan los HRE. En este modelo observamos que la expresión de HIF-1 α , VEGF y las quimiocinas CCL2 y CXCL12 aumentaban en los animales alérgicos en comparación con los controles y esto correlaciona además con el grado de severidad y con la remodelación del tejido pulmonar [22].

Estos hallazgos nos hablaban de la participación de HIF-1 en la enfermedad, sin embargo para evaluar su participación en la fisiopatogenia de la enfermedad utilizamos fármacos que modularan la expresión de la subunidad α , el 2-Metoxiestradiol (2ME2) que inhibe su actividad y el EDHB (ethyl-3,4-dihidroxibenzoato) que la activa simulando estado de hipoxia en el modelo murino de inflamación alérgica pulmonar. Observamos que al tratar a los animales alérgicos con el 2ME2 estos reducían el infiltrado inflamatorio perivascular y peribronquial, así como la producción de moco, los niveles de IgE OVA específica, la eosinofilia y la remodelación expresada como depósito de colágeno e hiperplasia del músculo de vasos y bronquios, también se observó la disminución de HIF-1 α y su gen blanco VEGF en comparación con los animales alérgicos que no fueron tratados [12]. En tanto con el EDHB observamos que los animales alérgicos presentan mayor infiltrado inflamatorio perivascular y peribronquial, incremento en la producción de moco, depósito de colágeno y el aumento de la expresión de las proteínas HIF-1 α y VEGF en el tejido pulmonar. Este incremento es estadísticamente significativo en comparación con los animales alérgicos que no recibieron el EDHB [22]

Estas evidencias se obtuvieron modificando la expresión de la subunidad α con fármacos, sin embargo el desarrollo de nuevas tecnologías en el ámbito científico permitieron el desarrollo de un ratón condicional inducible para la subunidad β , el cual obtuvimos en colaboración con el grupo del Dr. Hankinson en la UCLA, USA [23]. Con el cual observamos que al inhibir en ratones adultos HIF-1 β y posteriormente hacerlos alérgicos tanto la inflamación pulmonar, la producción de moco, la eosinofilia y los niveles de IgE e IgG1 OVA específica así como la expresión de VEGF disminuyen significativamente en comparación con los ratones que expresan niveles normales de la subunidad β . Estos resultados son de gran importancia

debido a que sin importar los niveles de proteína de la subunidad α no hay HIF-1 β para formar el dímero para ejercer su acción como factor de transcripción.

Todos estos resultados nos dieron las evidencias de que el factor de transcripción HIF-1 tiene un papel crucial en la fisiopatogenia de la inflamación alérgica pulmonar.

Los resultados de nuestros estudios en modelos experimentales fueron corroborados en muestras clínicas de pacientes alérgicos los cuales obtuvimos de nuestros colaboradores del Department of Immunology and Allergy of University of California, Los Angeles (UCLA), USA. En donde evaluamos la expresión de HIF-1 en un grupo de estudio bien caracterizado de 12 pacientes con asma alérgica a la caspa de gato, muestras que fueron obtenidas antes y después del reto alérgico específico (un cuarto con gatos). Los estudios se realizaron en muestras de lavados bronquioalveolares (BAL) (Figura.1R) y biopsias pulmonares, mediante tinciones por inmunocitoquímica.

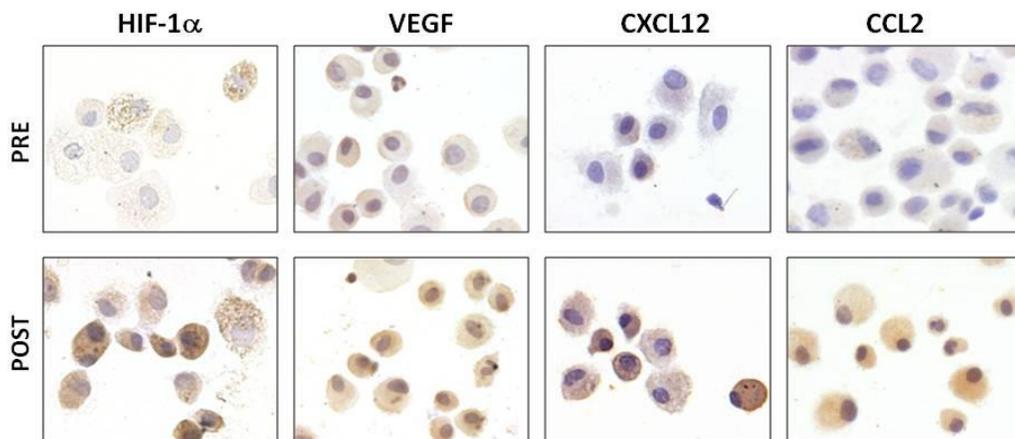


Figura 5. Micrografías representativas de una tinción de inmunocitoquímica realizada para las proteínas HIF-1 α , VEGF, CXCL12 y CCL2 en células de lavados bronquioalveolares (BAL) de pacientes adultos alérgicos pre y post reto alérgico. En donde se observa un claro aumento en la expresión de las diferentes proteínas en las muestras post reto. Aumento 100X.

Nuestros resultados demostraron un incremento significativo en los niveles de las proteínas HIF-1 α , VEGF, CCL2 y CXCL12 en las muestras post reto en comparación con las pre reto [24]. Adicionalmente encontramos una correlación directa entre la expresión de HIF-1 α y VEGF [24] que apoya los resultados encontrados por el grupo de Lee y colaboradores [11].

Sin embargo, a pesar de estos datos y como ya se mencionó, no existen estudios que muestren la participación del factor de transcripción HIF-1 en la fisiopatogenia del asma en pacientes pediátricos. Esto es importante ya que está bien establecido que esta enfermedad se comporta de manera diferente en adultos que en niños. Además de que no existen estudios en los que se analiza HIF-1 en los diferentes grados de severidad de la enfermedad, simplemente se ha comparado entre sujetos sanos y sujetos con asma. Es por ello que entender mejor el papel del factor de transcripción inducible en hipoxia 1 (HIF-1) en la fisiopatogenia de esta enfermedad es esencial. Abriendo la posibilidad de que en un futuro HIF-1 pueda ser un marcador pronóstico en el asma.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En nuestro país el asma tiene un prevalencia en niños de entre el 6-12% sin embargo se ha visto que esta va en aumento en el grupo de escolares, por lo que el asma sigue siendo un problema de salud. De esta manera, resulta necesario entender mejor la fisiopatogenia de la enfermedad.

Recientes estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, han demostrado que el factor de transcripción HIF-1 tiene un papel muy importante en la fisiopatogenia de la inflamación alérgica pulmonar en un modelo murino y que su expresión correlaciona con el grado de severidad de la enfermedad. Además se ha demostrado que la expresión de HIF-1 α y VEGF aumenta en pacientes alérgicos adultos después de la exposición al alérgeno, por lo que esto nos hace pensar que HIF-1 tiene un papel preponderante en el asma y este correlacione con la severidad de la enfermedad. No obstante, hasta el momento no se sabe cómo podría estarse comportando este factor transcripcional en niños.

Por ello, nuestro interés se centra en evaluar la expresión del factor de transcripción inducible en hipoxia 1 (HIF-1) en pacientes pediátricos con asma independientemente del grado de severidad, para determinar su implicación en la fisiopatogenia de la enfermedad.

6. JUSTIFICACIÓN

A la fecha no existen tratamientos efectivos contra el asma, pues los existentes solo ayudan al control de los síntomas generados por la exposición a alérgenos, causando una respuesta inflamatoria e hipoxia que a largo plazo induce cambios estructurales del tejido pulmonar provocados por la remodelación pulmonar.

Por lo que entender mejor el papel de HIF-1 ayudará a comprender la fisiopatogénesis de esta enfermedad en un grupo de pacientes pediátricos que son los más afectados por esta enfermedad. Esto nos permitirá en un futuro proponer nuevos y mejores factores pronóstico y/o blancos terapéuticos.

7. OBJETIVOS

7.1 General

Evaluar la expresión del factor de transcripción HIF-1 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes pediátricos de 6 a 17 años de edad con asma crónica y asma aguda y comparar los niveles de expresión de este factor de transcripción con muestras de sujetos sanos.

7.2 Específicos

- Evaluar la expresión de la proteína HIF-1 α , en células mononucleares purificadas de sangre periférica de pacientes pediátricos de 6 a 17 años de edad con asma crónica, asma aguda y en sujetos pediátricos sanos por medio de la técnica de inmunocitoquímica.
- Determinar en las muestras de pacientes con asma crónica, asma aguda y sujetos sanos la o las estirpes celulares que expresan HIF-1 α , mediante ensayos de citometría de flujo multíparamétrica.
- Realizar estudios de correlación entre la expresión de HIF-1, en células de sangre periférica purificadas de pacientes pediátricos con asma en comparación con sujetos pediátricos sanos.
- Estratificar los pacientes asmáticos por el tipo de asma aguda o crónica y ver si existe una correlación con la expresión de HIF-1 α .

8. HIPOTESIS

Si el factor de transcripción HIF-1 α tiene un papel central en la fisiopatogenia del asma su expresión correlacionará de manera directa con el grado de severidad de la enfermedad en comparación con etapas menos severas y con sujetos pediátricos sanos.

9. MATERIAL Y METODOS

9.1 Diseño del estudio

Se trata de un estudio transversal comparativo de casos (pacientes con asma) y controles, con selección aleatoria en pacientes pediátricos que acuden de manera regular al Servicio de Alergia del Hospital Infantil de México, Federico Gómez.

9.2 Definición del Universo Casos:

Se reclutaron 132 escolares y adolescentes del departamento de alergia e inmunología y de la escuela primaria y secundaria aledañas a la zona del hospital infantil de México. De estos cumplieron los criterios 106, clasificados de acuerdo al estado de salud, en 80 asmáticos y 52 sanos como grupo testigo. Del grupo de los asmáticos en base a los criterios de GINA de 2006, 53 presentaban asma leve intermitente controlada o asma leve persistente controlada y 27 asma aguda.

Se incluyeron los pacientes que tenían diagnóstico médico de asma (GINA 2011) con una evolución mayor de un año y una prueba de reversibilidad positiva durante alguna época de su enfermedad. Se excluyeron los pacientes que usaban más de una vez a la semana β -2 esteroides inhalados o sistémicos tres meses antes, con procesos de infección respiratorios, con tabaquismo pasivo o activo, que usaran algún medicamento que pudiera alterar el factor de transcripción HIF-1.

Todos los pacientes después de firmar la carta de consentimiento (tutores) y asentimiento, fueron sometidos a una historia clínica completa y dirigida con respecto a su estado de función pulmonar y a la toma de muestra sanguínea.

9.3 Selección de pacientes

9.3.1 ASMA

1) Criterios de inclusión

- a) Diagnóstico de asma intermitente o persistente, sin crisis aguda.
- b) Espirometría con VEF 1 menor del 85% y con reversibilidad con beta dos agonista igual o mayor al 12%, actual o hasta un año de antigüedad.
- c) No estar cursando con ningún cuadro infeccioso en las últimas 4 semanas.

- d) Que tenga una prueba positiva para uno o más aeroalérgenos.
 - e) Que carezca de cualquier otra patología respiratoria o de cualquier otro tipo.
- 2) Criterios de no Inclusión
- a) Que estén recibiendo o hayan recibido inmunoterapia alérgeno específica.
 - b) Que esté utilizando o haya utilizado cualquier antibiótico en las últimas 4 semanas.
- 3) Consideraciones especiales
- a) Se permite el uso de los siguientes medicamentos. Salbutamol, bromuro de ipratropio, salmeterol, formoterol, montelukast, teofilina o aminofilina, cualquier tipo de antihistamínico
 - b) Se permite el uso de esteroide inhalado a una dosis no mayor de 200µgr de fluticasona o su equivalente, sin haberse modificado en las últimas 4 semanas.

9.3.2 CONTROLES

- 1) Criterios de inclusión
- a) Sujetos sanos.
 - b) Sin enfermedades atópicas activas.
 - c) No presentar sensibilización a ningún aeroalérgeno.
 - d) Espirometría con VEF1 mayor al 85% sin reversibilidad al uso de salbutamol.- Deben de estar libres de cualquier infección de las vías respiratorias o a cualquier otro nivel, en las últimas dos semanas.
 - e) No estar cursando con ningún cuadro infeccioso en las últimas 4 semanas.
 - f) No haber recibido terapia con antibióticos en las últimas 4 semanas.
- 2) Criterios de no inclusión
- a) Que padezca cualquier otra enfermedad.
 - b) Que utilice cualquier otro medicamento diferente a la lista de los permitidos.
- 3) Consideraciones especiales
- a) Puede utilizar cualquier tipo de AINE.
- 4) Criterios de exclusión general
- a) Que no deseen participar en el estudio.

- b) Que no firme el consentimiento informado.
- 5) Criterios de eliminación general
- a) Embarazo.
 - b) Exacerbación asmática grave.
 - c) Cualquier otro evento serio que ponga en riesgo su salud.

9.4 Tamaño de la muestra

Para el tamaño de muestra y tomando en cuenta que es un experimento piloto, se consideraron dos grupos: un grupo de 80 pacientes asmáticos pediátricos y un grupo de 52 sujetos controles.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevará a cabo en dos fases:

- 1) En la primera parte se realizó un análisis bivariado para identificar diferencias en las variables de interés entre grupos: casos (pacientes con asma crónica y aguda) y controles (sujetos sanos), en relación con la expresión HIF-1 mediante:
Variable dependiente HIF-1 α : y así para cada variable que se desea analizar.
- 2) Se estableció una comparacione de medias a través de la t student.

Una vez que se identificaron las variables con posibles diferencias entre grupos, se corrió un análisis de regresión múltiple para definir los posibles efectos de las variables en conjunto del paciente con respecto a la presencia o expresión de la proteína HIF-1.

9.5 Estadística descriptiva

Porcentaje, media, desviación estándar.

9.6 Estadística analítica o Inferencial:

Para establecer diferencias entre los distintos grupos se empleó lo siguiente:

- a) Cuando se encontró distribución normal.
 - ANOVA: cuando se contrasten más de dos variables cualitativas contra una cuantitativa.

b) Si no se encontró distribución normal.

- Prueba de Kruskal-Wallis cuando se contrastaron más de dos variables cualitativas contra una cuantitativa

El estudio en todas sus etapas se llevó a cabo en estricto apego a las normas y regulaciones éticas establecidas universal e institucionalmente. Previo consentimiento informado.

9.7 Operacionalización

Los pacientes pediátricos de entre 6 a 17 años que acudieron de manera diaria a la consulta de alergia fueron reclutados por el médico encargado del área, el cual verificó que se cumplan los criterios de inclusión del estudio, A todos se les comentó nuestro interés de que participaran en el estudio y una vez que se mostraron interesados se platicó a detalle y se firmó la carta de consentimiento informado.

Después de realizar la toma de la muestra en el laboratorio de alergia en un tubo con anticoagulante (5mL), esta fue transportada a la unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas donde fueron procesadas.

Cada paciente fue identificado asignándole un número secuencial a las iniciales de su primer y segundo apellidos más su primer nombre. El número de expediente y los datos demográficos también fueron tomados.

9.8 Muestras Clínicas.

Los pacientes que se incluyeron en este estudio, fueron categorizados por los médicos pediatras del Departamento de Inmunología y alergia, de acuerdo a los criterios de GINA 2006 y para determinar su control se emplearon los criterios GINA 2010. Se conoce que el 70-80% de los pacientes que se atienden en nuestro hospital presentan asma leve persistente, 15 % asma moderada y 5% asma grave. Lo cual es consistente con lo que se presenta en otros hospitales.

Se estudiaron las muestras de sangre periférica de pacientes con asma alérgica crónica y aguda, que acudieron a la consulta externa del Servicio de Alergia o en el Área de Urgencias del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Al ingreso del paciente se realizó la historia clínica correspondiente y se llenó un formato con datos específicos de cada paciente. A cada paciente se le realizó una biometría hemática. Los grupos controles para sangre periférica, fueron obtenidos de niños sanos obtenidos de escuelas, previo consentimiento informado o pacientes que acudieron al hospital. La toma de muestra de sangre periférica fué realizada por los médicos residentes del departamento de Alergia en las consultas de control así como en

el área de urgencias en el caso de pacientes con crisis alérgica. Las muestras fueron enviadas a la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas para su procesamiento.

9.9 Purificación de células de sangre periférica y preparación de laminillas.

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

9.10 Ensayo de inmunocitoquímica

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

Posteriormente, las secciones se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-HIF-1 α . Después de lavar las laminillas se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado a biotina y posteriormente con estreptavidina conjugada a HRP, por último el color se generó mediante la adición del substrato diamino benzidina (DAB) 2 minutos; la reacción se paró con agua de la llave y las células se contratiñeron con hematoxilina. Finalmente las células se deshidrataron y montaron con resina. Las laminillas se analizaron en un microscopio (Olimpus, BX-40) y las células positivas (color café) se cuantificaron en 4 campos/ laminilla, utilizando un analizador de imágenes (Image-Pro Plus®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD.USA).

9.11 Citometría de flujo.

Se realizó una tinción extracelular de células CD4, CD8, Linfocitos B, macrófagos y células dendríticas y posteriormente una tinción intracelular de HIF-1 α para ello utilizamos el kit Foxp3 Fixation/Permeabilization (eBiosciences). Brevemente, se fijaron y permeabilizaron células mononucleares de sangre periférica de pacientes y controles sanos, con la solución reguladora para la permeabilización y fijación, se preparó de acuerdo a las indicaciones del

fabricante, durante 1.5 horas a 4 °C en oscuridad. Se lavaron las células con solución reguladora para permeabilizar 1X. Se realizó la tinción de CD4, CD8, Linfocitos B, macrófagos, células dendríticas de HIF-1 α con los anticuerpos específicos acoplados a diferentes fluorocromos. Los anticuerpos se incubaron durante 1 hora a 4 °C en oscuridad. Las células se lavaron 2 veces con solución reguladora para permeabilizar 1X. Se resuspendieron en PBS y se cuantificó la intensidad media de fluorescencia en un citómetro FACS Calibur (Hospital de Especialidades del CMN SXXI).

9.12 Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva obteniendo medidas de tendencia central como la media, desviación estándar, error estándar, frecuencia e Intervalos de Confianza 95% (IC95%). Se analizó por ANOVA corregido Post HOCK para análisis de tres grupos (ALI, ALP y Sanos) y T de Student de muestras independientes para evaluar dos grupos (asmáticos vs sanos). Con un nivel de significancia de 0.05. Se hizo una correlación de Pearson del grupo de asmáticos vs sanos. Programa SPSS 16.

De los resultados de la tinción de inmunocitoquímica se elaboró una base de datos y la información se procesó utilizando el programa de análisis estadístico Prism 4© de GraphPad Software, Inc., San Diego, CA. Los datos se presentaron mediante medias aritméticas de cada grupo y desviación estándar. $p \leq 0.05$ considerándose como significativa.

10. RESULTADOS

1. Datos clínicos de la población de estudio.

De los 106 pacientes estudiados, la edad media en años y DS del grupo de ALI: 12 ± 0.25 , ALP: 12.56 ± 0.064 y los testigos de: 12.02 ± 0.22 sin diferencia significativa. Con distribución por género de manera semejante en los grupos con 56 masculinos y 50 femeninos. De acuerdo a su diario de síntomas no hubo datos clínicos de descontrol de su padecimiento.

Tanto en el HIF citoplasmático como en el HIF nuclear hubo diferencia significativa en los asmáticos en comparación de los sanos. El resumen de las características clínicas de los pacientes se muestra en la **Tabla 3**.

2. La expresión de HIF-1 α se ve aumentada en pacientes pediátricos con asma.

De acuerdo a los resultados ya publicados en nuestros modelos animales y en los lavados bronqueolares y tejido pulmonar de pacientes adultos con asma en donde se reportó la importancia de HIF-1 en el asma. Era importante para nosotros evaluar la expresión de este factor de transcripción en muestras de sangre periférica de pacientes pediátricos con esta enfermedad. Para lo cual como se menciona con detalle en la sección de materiales y métodos, las células mononucleares de sangre periférica fueron purificadas mediante gradientes de densidad, posteriormente se prepararon laminillas para realizar la tinción de inmunohistoquímica en donde utilizamos un anticuerpo anti-HIF-1 α . En la **figura 7**, se muestra una microfotografía de la inmunotinción en nuestro grupo de control sano (**Figura 7B**), nuestro grupo de pacientes con asma crónica (**Figura 7C**) y el grupo de pacientes con asma aguda (**Figura 7D**). Se puede observar de manera clara que existe un aumento muy importante de la expresión de HIF-1 α en los pacientes con asma en comparación con los sujetos sanos. De manera muy interesante si se compara la expresión entre el asma crónica y aguda, que en este último grupo la expresión es mucho mayor que en comparación con los pacientes con asma crónica. La expresión de HIF-1 α es citoplásmica en el grupo de sujetos sanos, pero en el grupo de pacientes con asma crónica se ve un aumento en la tinción nuclear, aunque también existe tinción citoplasmática importante. Sin embargo en el grupo de asma aguda la tinción es primordialmente nuclear. Como esperábamos no se observa tinción alguna en el control isotipo (**Figura 7A**).

Las diferencias de la expresión fueron estadísticamente significativas cuando se compararon los grupos de sujetos sanos con asma crónica o asma aguda ($p < 0.05$). También se observó una diferencia significativa muy importante entre el grupo de pacientes con asma aguda en comparación con el grupo de asma crónica ($p < 0.05$). Todo lo anterior se muestra en la **Figura 8**. Esta diferencia se observa mucho mejor en la células con tinción nuclear de HIF-1 α en comparación con la expresión total de este factor de transcripción.

Estos resultados muestran por primera vez, el aumento en la expresión de HIF-1 después en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con asma en comparación con sujetos sanos. Además que el aumento en la expresión de este factor se ve exacerbado en pacientes con asma aguda.

3. Los linfocitos B y macrófagos son las principales células mononucleares que expresan HIF-1 α .

Con el propósito de identificar las células dentro de la población de mononuclear purificada de sangre periférica de los pacientes con asma, realizamos un análisis de citometría de flujo multiparamétrica para identificar CD4+ (anticuerpo anti-CD4), CD8+ (anticuerpo anti-CD8), macrófagos (anticuerpo anti-CD14) y linfocitos B (anticuerpo anti-CD19) que expresan HIF-1 α . Los resultados que se muestran en la **Figura 9**, demuestran que los linfocitos B y los macrófagos son las principales células que expresan HIF-1 α , aunque también se expresa en menor cantidad en células CD4+ y CD8+. Se observa claramente como la expresión de HIF-1 α en linfocitos B es mayor en las muestras provenientes de pacientes con asma aguda en comparación con los pacientes con asma crónica y controles sanos. Aunque existe un aumento importante también entre el grupo de asma crónica y los sujetos sanos. Como era de esperarse no existe tinción en el control de isotipo (control negativo).

Grupo	Número	fem	mas	Edad		HIF- α 1 % Total	IC95%		HIF-1 α Nuclear	IC95%	
				MEDIA	DS		(MEDIA)	BAJO		ALTO	(MEDIA)
Sanos	52	26	27	12.08	1.591	21.40	16.83	25.97	2.83	1.60	4.06
Asma crónica	53	22	31	12.21	2.023	63.53	57.49	69.56	5.85	3.92	7.78
Asma aguda	27	12	15	9.52	2.953	96.91	94.67	99.15	33.65	25.56	41.73

*p<0.05 Chi2 edad asma aguda vs testigo y asma crónica
Entre los tres grupos P<0.05 ANOVA POST HOCK
Testigo vs asma aguda y crónica
Asma aguda vs asma crónica

Figura 6. Características clínicas de nuestros pacientes y sujetos control.

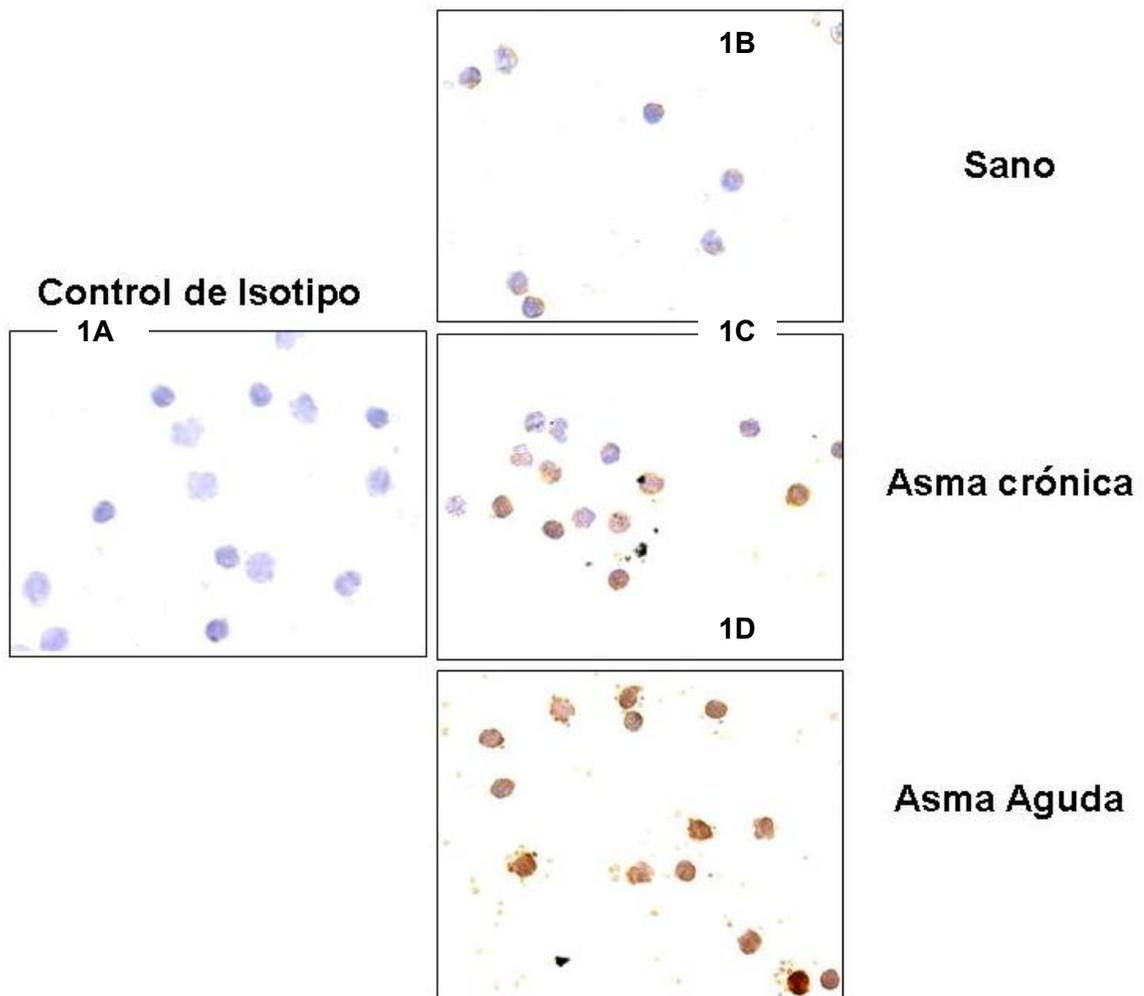


Figura 7. La expresión de HIF-1 α se ve aumentada en pacientes pediátricos con asma. La expresión de HIF-1 α fue evaluada mediante inmunocitoquímica como se describe con detalle en la sección de materiales y métodos. La microfotografía representativa de los resultados muestran claramente un aumento en la expresión de este factor de de transcripción (color café) en pacientes con asma en comparación con los sujetos sanos. De manera muy interesante se observa que en el grupo de los pacientes con asma se encuentra mayormente expresado con asma aguda en comparación con el asma crónica. La expresión fue primordialmente a nivel nuclear, aunque también se observa importante expresión a nivel citoplasma. El control de isotipo (control negativo) no muestra tinción. Magnificación 100X.

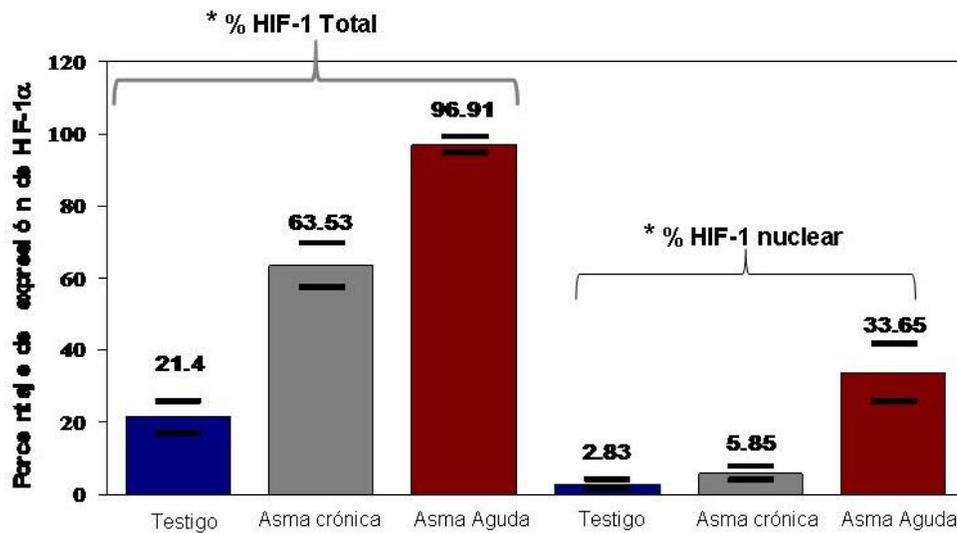


Figura 8. La expresión de HIF-1 α se ve aumentada en pacientes pediátricos con asma. La tinciones de inmunocitoquímica de la expresión de HIF-1 α fue evaluada mediante como se describe con detalle en la sección de materiales y métodos. Los resultados muestran claramente un aumento en la expresión de este factor de de transcripción en pacientes con asma en comparación con los sujetos sanos ($p < 0.05$ ANOVA post Hock). De manera muy interesante se observa que en el grupo de los pacientes con asma se encuentra mayormente expresado con asma aguda en comparación con el asma crónica ($p < 0.05$ ANOVA post Hock). Tanto HIF-1 α total como HIF-1 α nivel nuclear.

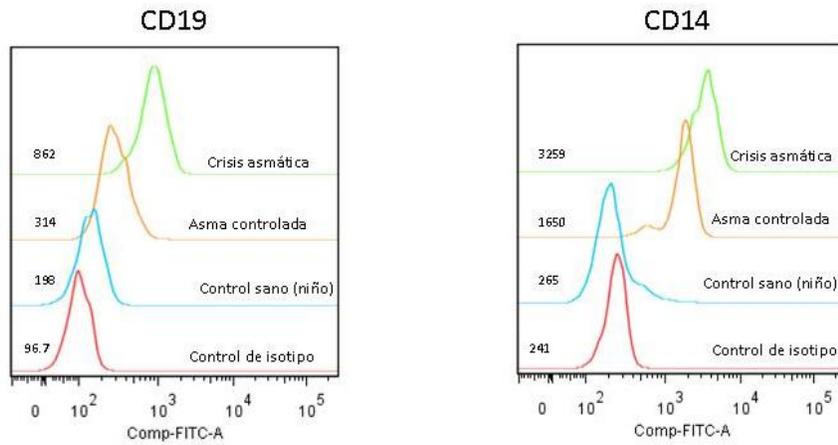


Figura 9. La expresión de HIF-1 α se ve aumentada principalmente en linfocitos B y macrófagos. Se identificaron las poblaciones celulares que expresaban HIF-1 α mediante citometría de flujo multiparamétrica como se describe con detalle en la sección de materiales y métodos. Los resultados se muestran en un histograma representativo, que la población celular con mayor expresión de este factor de transcripción fueron los linfocitos B (tinción de CD19) y los macrófagos (expresión de CD14).

11. DISCUSION

HIF-1 es un factor de transcripción que es reconocido como el regulador maestro de procesos en donde el oxígeno juega un papel central. Es activado en la respuesta celular a la disponibilidad de oxígeno, y regula diversos genes que tienen que ver con eritropoyesis, apoptosis, glicólisis, angiogénesis, hematopoyesis, quimiotaxis entre otros [25]. Sin embargo, hace algunos años se reportó que también puede ser regulado en condiciones de inflamación [26-29]. HIF-1 participa en la fisiopatología de diversas enfermedades. Su papel ha sido más estudiado en padecimientos que se caracterizan por tener procesos de hipoxia, como cáncer, hipertensión pulmonar, sepsis o isquemia (REF). Sin embargo, poco se ha estudiado en otras enfermedades en las que pudiesen existir otras vías de activación independientes de hipoxia tisular. Nuestro grupo de trabajo desde hace algunos años ha estado interesado en estudiar la implicación de HIF-1 α en la fisiopatogénesis de la inflamación alérgica pulmonar en modelos experimentales y en muestras de pacientes adultos con asma [24].

Se sabe que HIF-1 participa de manera importante en las enfermedades alérgicas pulmonares. En 2006 el grupo de Kim y cols [27] reportaron que HIF-1 se encuentra elevado en biopsias de tejido pulmonar de pacientes asmáticos, y que el incremento correlaciona con la presencia de VEGF [23]. Guo y cols, [30] demostraron que ratones heterocigotos parcialmente deficientes de HIF-1 α protegen de la eosinofilia en un modelo de inflamación alérgica pulmonar a OVA [31]. Un estudio realizado en un modelo de inflamación pulmonar por cobalto, demostró que utilizando ratones deficientes de HIF-1 α desarrollan una respuesta de tipo alérgica con presencia de eosinofilia, en contraste con los ratones control en los que la exposición al cobalto genera neutropenia y fibrosis [32]. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que el cobalto es un inductor de la subunidad α al ser un quelante de la prolilhidroxilasa, simulando estados de hipoxia. Por lo que en este último trabajo los autores no demostraron evidencia suficiente que demostrara la participación directa de HIF-1 en el desarrollo de la inflamación alérgica pulmonar.

Los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo demostraron la participación de HIF-1 α durante la inflamación alérgica pulmonar, encontrando el aumento del infiltrado inflamatorio, la hiperreactividad y permeabilidad vascular, así como la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 en un modelo murino después de la exposición al alérgeno (OVA). Adicionalmente se utilizó un inhibidor de HIF-1 α 2ME2 como tratamiento en su modelo murino, observando la disminución

de la inflamación alérgica [33]. También demostramos por primera vez que la exposición al alérgeno sobrerregula la expresión de HIF-1 α y su gen blanco VEGF en LBA y biopsias de pacientes asmáticos, lo que sustenta la participación de HIF-1 en el desarrollo de la alergia pulmonar. Este estudio apoya la idea de que la activación de HIF-1 es necesaria para la (sensibilización al alérgeno) respuesta alérgica, lo cual permite proponer que el factor de transcripción HIF-1 α sea utilizado como blanco terapéutico en las enfermedades alérgicas. Los resultados de nuestro grupo de trabajo en muestras de humanos y sustentados en modelos animales sugieren que los niveles de HIF-1 α podrían ser un biomarcador en el asma.

Sin embargo hasta la fecha no existen trabajos donde se evalúe la posible implicación de HIF-1 α en el asma pediátrica. Esta evaluación es de suma importancia si se toma en cuenta que se trata de la principal población que sufre de este padecimiento. Por tal motivo fue de nuestro interés evaluar la expresión de este factor de transcripción en pacientes pediátricos con asma y lo comparamos con sujetos pediátricos sanos. Además evaluamos los tipos de severidad del asma pediátrica como lo es asma crónica y asma aguda. Por otro lado fue de nuestro interés evaluar la expresión de HIF-1 α en células mononucleares de sangre periféricas, esto debido a que se trata de un método poco invasivo, lo cual permitiría obtener muestra que el menos de los riesgos en este tipo de pacientes y además de manera rápida. Esto si lo comparamos con muestras obtenidas de lavados broquioalveolares y biopsia de tejido pulmonar que son utilizadas para evaluar la expresión de ciertos marcadores en pacientes adultos con asma. Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este proyecto demostraron que las células mononucleares de sangre periférica purificadas de pacientes pediátricos con asma, presentan una mayor expresión del factor de transcripción HIF-1 α en comparación con los sujetos pediátricos sanos y esta diferencia fue estadísticamente significativa (Figuras 6 y 8). De manera interesante también existe un aumento de la expresión de este factor de transcripción en las células mononucleares purificadas de pacientes con diferentes estadios de asma, el asma crónica en la que la mayor parte de tiempo los pacientes están controlados y se considera un asma menos severa para los pacientes, la expresión de HIF-1 α es menos que en el caso del asma aguda en donde el paciente está cursando con una denominada crisis asmática, que de no ser atendida oportunamente y de la manera adecuada, puede comprometer la vida del paciente. Por lo que el asma aguda es considerada un tipo más grave de esta enfermedad. Resultado que sugiere fuertemente que HIF-1 α está jugando un papel muy importante en la fisiopatogénesis del asma pediátrica. Lo cual ya fue demostrado por nuestro grupo de trabajo en pacientes adultos con esta enfermedad [24]. Por otro lado,

también fue de nuestro interés demostrar que tipo de células mononucleares expresan en mayor cantidad HIF-1 α , para lo cual utilizamos la técnica de citometría de flujo multiparamétrica en donde con diferentes anticuerpos que pueden ser utilizados en la misma tinción, debido a que estos anticuerpos están acoplados a distintos fluorocromos, podemos identificar el fenotipo de la células que está expresando HIF-1 α . Los resultados demostraron que las principales células que expresan este factor de transcripción en el tipo de muestra que utilizamos son los linfocitos B y los macrófagos (Figura 3), aunque también es expresado en linfocitos CD4+ y CD8+ en menor cantidad. Los resultados son semejantes con lo ya reportado en donde se demuestra que los macrófagos representan las principales células productoras de HIF-1 α [34]. Consideramos de suma importancia estudios más profundos que nos ayuden a dilucidar la implicación de la expresión diferencial de este factor de transcripción en los diferentes fenotipos de células implicadas en la respuesta inmune.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran por primera vez que la expresión de HIF-1 α se encuadra aumentada en pacientes pediátricos con asma en comparación con sujetos sanos. Además la expresión HIF-1 α correlaciona con la forma más grave de la enfermedad y se expresa principalmente en linfocitos B y macrófagos. Por otro lado también demostramos por primera vez, que las células mononucleares de sangre periférica, constituyen una muestra adecuada para evaluar la expresión de HIF-1 α y muy posiblemente de otras importantes proteínas involucradas en esta enfermedad. Los resultados sugieren fuertemente que la evaluación de la expresión de HIF-1 α puede ser utilizada como un factor pronóstico y/o blanco terapéutico en el asma pediátrica.

12. CONCLUSIONES

El conjunto de experimentos que se presentan en este trabajo permitió demostrar por primera vez la importancia de lo siguiente:

1. La expresión del factor de transcripción HIF-1 α se encuentra aumentado en pacientes pediátricos con asma en comparación con sujetos sanos.
2. La expresión del factor de transcripción HIF-1 α se encuentra mayormente aumentado en pacientes pediátricos con asma crónica en comparación con pacientes con asma aguda.
3. Se sugiere que HIF-1 tiene una participación análoga en el asma alérgica en pacientes adultos y pacientes pediátricos.
4. Que la muestra de células mononucleares purificadas de sangre periférica de pacientes pediátricos con asma, es adecuada para evaluar la expresión HIF-1 α y muy probablemente de otros marcadores importantes implicados en el asma.
5. Se sugiere que HIF-1 α puede ser un marcador de progresión o gravedad del asma alérgica pediátrica.

13. REFERENCIAS

1. Venables, K.M. and M. Chan-Yeung, *Occupational asthma*. Lancet, 1997. **349**(9063): p. 1465-9.
2. Chetta, A., et al., *Vascular endothelial growth factor up-regulation and bronchial wall remodelling in asthma*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(11): p. 1437-42.
3. Hopfl, G., O. Ogunshola, and M. Gassmann, *Hypoxia and high altitude. The molecular response*. Adv Exp Med Biol, 2003. **543**: p. 89-115.
4. Cookson, W., *The alliance of genes and environment in asthma and allergy*. Nature, 1999. **402**(6760 Suppl): p. B5-11.
5. Prescott, S.L., et al., *Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile*. J Immunol, 1998. **160**(10): p. 4730-7.
6. Gould, H.J. and B.J. Sutton, *IgE in allergy and asthma today*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(3): p. 205-17.
7. Noah, T.L. and S. Becker, *Chemokines in nasal secretions of normal adults experimentally infected with respiratory syncytial virus*. Clin Immunol, 2000. **97**(1): p. 43-9.
8. Rothenberg, M.E., *Eosinophils in the new millennium*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(6): p. 1321-2.
9. Busse, W.W., *The brain and asthma: what are the linkages?* Chem Immunol Allergy, 2012. **98**: p. 14-31.
10. Chetta, A., et al., *Vascular remodelling and angiogenesis in asthma: morphological aspects and pharmacological modulation*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2007. **6**(1): p. 41-5.
11. Lee, S.Y., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor in the airway of asthmatic patients*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2006. **97**(6): p. 794-9.
12. D'Amato, R.J., et al., *2-Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 3964-8.
13. De Falco, S., B. Gigante, and M.G. Persico, *Structure and function of placental growth factor*. Trends Cardiovasc Med, 2002. **12**(6): p. 241-6.
14. Dahut, W.L., et al., *Phase I clinical trial of oral 2-methoxyestradiol, an antiangiogenic and apoptotic agent, in patients with solid tumors*. Cancer Biol Ther, 2006. **5**(1): p. 22-7.
15. Dehne, N. and B. Brune, *HIF-1 in the inflammatory microenvironment*. Exp Cell Res, 2009. **315**(11): p. 1791-7.
16. Hankinson, O., *The aryl hydrocarbon receptor complex*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1995. **35**: p. 307-40.
17. Elias, J.A., *Airway remodeling in asthma. Unanswered questions*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(3 Pt 2): p. S168-71.
18. Lemanske, R.F., Jr., *Inflammatory events in asthma: an expanding equation*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(6 Pt 2): p. S633-6.
19. Pare, P.D., et al., *The comparative mechanics and morphology of airways in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease*. Am Rev Respir Dis, 1991. **143**(5 Pt 1): p. 1189-93.
20. Becker, P.M., et al., *Neuropilin-1 regulates vascular endothelial growth factor-mediated endothelial permeability*. Circ Res, 2005. **96**(12): p. 1257-65.
21. Voelkel, N.F., R.W. Vandivier, and R.M. Tuder, *Vascular endothelial growth factor in the lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290**(2): p. L209-21.

22. Tanaka, H., et al., *Increased airway vascularity in newly diagnosed asthma using a high-magnification bronchovideoscope*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(12): p. 1495-9.
23. Kourembanas, S., et al., *Mechanisms by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature*. Kidney Int, 1997. **51**(2): p. 438-43.
24. Huerta-Yepez, S., et al., *Hypoxia inducible factor promotes murine allergic airway inflammation and is increased in asthma and rhinitis*. Allergy, 2011. **66**(7): p. 909-18.
25. Kamath, K., et al., *2-Methoxyestradiol suppresses microtubule dynamics and arrests mitosis without depolymerizing microtubules*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(9): p. 2225-33.
26. Karpus, W.J., et al., *Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production*. J Immunol, 1997. **158**(9): p. 4129-36.
27. Kim, S.R., et al., *HIF-1alpha inhibition ameliorates an allergic airway disease via VEGF suppression in bronchial epithelium*. Eur J Immunol, 2010. **40**(10): p. 2858-69.
28. Koh, M.Y., B.G. Darnay, and G. Powis, *Hypoxia-associated factor, a novel E3-ubiquitin ligase, binds and ubiquitinates hypoxia-inducible factor 1alpha, leading to its oxygen-independent degradation*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(23): p. 7081-95.
29. Koh, M.Y. and G. Powis, *HAF : the new player in oxygen-independent HIF-1alpha degradation*. Cell Cycle, 2009. **8**(9): p. 1359-66.
30. Guo, J., et al., *Enhanced interferon-gamma gene expression in T Cells and reduced ovalbumin-dependent lung eosinophilia in hypoxia-inducible factor-1-alpha-deficient mice*. Int Arch Allergy Immunol, 2009. **149**(2): p. 98-102.
31. Kourembanas, S., et al., *Hypoxic responses of vascular cells*. Chest, 1998. **114**(1 Suppl): p. 25S-28S.
32. Kozak, K.R., B. Abbott, and O. Hankinson, *ARNT-deficient mice and placental differentiation*. Dev Biol, 1997. **191**(2): p. 297-305.
33. Kryczek, I., et al., *The chemokine SDF-1/CXCL12 contributes to T lymphocyte recruitment in human pre-ovulatory follicles and coordinates with lymphocytes to increase granulosa cell survival and embryo quality*. Am J Reprod Immunol, 2005. **54**(5): p. 270-83.
34. Yu, A.Y., et al., *Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung*. Am J Physiol, 1998. **275**(4 Pt 1): p. L818-26.

14. ANEXO



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ
Instituto Nacional de Salud

CARTA DE CONSENTIMIENTO

Nombre del Estudio: Evaluación de la expresión del factor de transcripción inducible en hipoxia 1 (HIF-1) en la fisiopatogenia del asma en pacientes pediátricos.

Protocolo No: HIM/2011/020

Médico del Estudio: Dr. Jaime M. del Rio Chivardi

Se invita a su hijo(a) a participar en un estudio de investigación. Este formato de consentimiento tiene información que le ayudará a decidir si desea que su hijo(a) participe en el mismo. Tómese el tiempo que necesite, lea cuidadosamente este formato y haga las preguntas que tenga al médico o personal del estudio.

Acerca de Este Estudio

El propósito de este estudio es:

Determinar la función que tiene una sustancia presente en nuestro cuerpo llamada HIF-1 en el asma, esta sustancia es una proteína que controla los cambios en el nivel de oxígeno y por la inflamación en el cuerpo, se ha visto que este factor aumenta en los pacientes con asma en comparación con individuos sanos pero en población adulta. Por lo que este estudio podría ayudar a entender más la enfermedad en niños, y crear nuevos tratamientos.

¿Qué se le pedirá a mi hijo(a) que haga?

Si su hijo(a) participa en el estudio, deberá hacer lo siguiente:

Que acuda en una ocasión al servicio de Alergia e Inmunología del Hospital Infantil de México Federico Gómez, para practicarle un examen médico completo y elaborar un expediente clínico, realizar pruebas de función pulmonar llamada espirometría, la cual se realiza mediante una respiración forzada y la toma de 2 muestras de sangre, para determinar la concentración de HIF-1 α , VEGF y CCL2.

Si su hijo llegara a sufrir una crisis asmática al acudir al Área de Urgencias notificarle al Médico residente de su participación en el estudio.

¿Qué efectos podrían ocasionar estas pruebas en mi hijo(a)?

El riesgo de que se produzca un efecto secundario o complicación es mínimo, probablemente su hijo(a) sienta dolor o ardor durante la toma de sangre, se han reportado casos de presión arterial baja por el estrés (nervios) que producen todos los procedimientos que se realizaran.

Al realizar las pruebas de función respiratoria solo se han reportado casos de cansancio físico y mareo sin ninguna consecuencia.

En todos estos casos, el personal médico que realiza estas pruebas está altamente capacitado para cortar las reacciones y solucionarlas.

¿Se utilizara algún tipo de medicamento?

Se aclara que no estamos utilizando ningún medicamento en su hijo(a).

Puede existir razones por las cuales a su hijo(a) no se le permitirá participar en este estudio.

Algunas de ellas son:

- Su hijo(a) es menor de 6 años de edad o mayor de 12 años de edad.
- Si padece asma en su forma grave o ha tenido episodios de asma casi fatal.
- Si padece alguna otra enfermedad diferente a asma.
- Si se encuentra tomando esteroides sistémicos o los ha tomado en las últimas 2 semanas
- Si incremento la dosis de los esteroides inhalados en las últimas 2 semanas a más de 200 mcg de fluticasona o su equivalente
- Si ha sido operado en las últimas 4 semanas
- Si se encuentra cursando un cuadro de infección de vías aéreas o lo tuvo en los últimos 10 días.

El médico o el personal del estudio discutirá estos puntos con usted, así como cualquier otra razón por la cual probablemente su hijo(a) no pueda participar en el estudio.

¿Qué sucederá durante las visitas del estudio?

El estudio está diseñado para realizar el procedimiento en una sola visita, por lo que solo se repetirá el procedimiento cuando existan resultados anormales, confusos o a juicio del médico, deban de ser repetidos.

- Revisar la historia médica de su hijo(a).
- Realizar un examen físico
- Medir sus signos vitales (presión arterial, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria y temperatura)
- Toma de muestras de sangre
- Realización de pruebas de metacolina y función pulmonar
-

Información Adicional que Necesita Saber

Si mi hijo(a) sufre alguna lesión como consecuencia del procedimiento, el responsable del estudio verificara que se le proporcione el tratamiento médico necesario.

¿Qué beneficio se podría esperar por participar en el estudio?

El beneficio inmediato es la detección oportuna de las alteraciones de su función respiratoria y alérgica, iniciando un tratamiento y limitando las complicaciones de la enfermedad.

Un beneficio para toda la población de niños mexicanos es determinar o no la relación que puede existir entre el HIF-1 y la gravedad del asma. Lo que nos dará información nueva para el desarrollo de nuevos tratamientos, que con más estudios pudiera ser una de las soluciones al problema.

¿Cuáles son mis opciones si mi hijo(a) no participa en el estudio?

Su hijo(a) no está comprometido a participar en el estudio, si en su momento no lo desea, no existe ninguna consecuencia ni acción en su contra, la atención que recibe de manera regular en el hospital seguirá siendo la misma.

¿De qué manera se protegerá la privacidad de mi hijo(a)?

Si usted decide participar en este estudio, el médico y el equipo de investigación del estudio utilizarán la información de la salud de su hijo(a) para realizar el presente estudio. Esta información puede incluir el nombre, dirección, número de teléfono, historia médica e información de su hijo(a) durante el estudio.

En este estudio, el equipo de investigación compartirá la información sobre la salud de su hijo(a) con agencias de gobierno y comités de ética que supervisan la investigación.

Usted puede retirar su permiso para usar y compartir la información sobre la salud de su hijo(a), en cualquier momento, solicitándolo por escrito al médico del estudio. En caso que usted solicitara esto, su hijo(a) no podrá continuar en este estudio. Después de esa fecha, no

se juntaría nueva información sobre la salud de su hijo(a). Sin embargo, la información sobre la salud de su hijo(a) que se reunió antes podrá seguir siendo utilizada y proporcionada a terceros, tal como se describe en el este formato.

Cuando el estudio concluya, usted puede pedirle por escrito al médico del estudio ver la información sobre la salud de su hijo(a) que se recopiló durante el estudio.

¿Hay algún costo involucrado en el estudio? O ¿Se me pagará?

Usted no recibirá pago alguno por participar en este estudio, tampoco se le cobrará. Los gastos de los procedimientos, exámenes de laboratorio y pruebas de función respiratoria descritos en el protocolo, así como los costos de la consulta médica a las que tenga que acudir, serán proporcionados por el hospital.

¿A quién debo llamar si tengo preguntas acerca de...?

- El estudio: Dr. Jaime M Del Río Chivardi al 52289917 ext. 2150
- Una lesión relacionada con el estudio: Dra. Blanca Estela Del Río Navarro al 5228-9917 ext. 2150

Al firmar a continuación, acepto que:

- He leído este formato de consentimiento.
- He tenido la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas.
- Entiendo que la participación en este estudio es voluntaria.
- Doy permiso para que se use y comparta la información sobre mi salud, tal como se describe en este formato.
- Puedo elegir que mi hijo(a) no participe en el estudio o que lo abandone en cualquier momento, comunicándoselo al médico del estudio. Mi hijo(a) no será sancionado ni perderá ningún beneficio que, de otra manera, le corresponde.
- Es probable que mi hijo(a) tenga que abandonar el estudio sin mi consentimiento en caso de requerir otro tratamiento, si no sigue el plan del estudio, si sufre alguna lesión relacionada con el estudio o por cualquier otra razón.

Después de haber leído el presente documento y contestado todas mis preguntas

Acepto No acepto

Que mi hijo _____ participe en el presente estudio.

Nombre de mi hijo(a)

Firma

Fecha

Firma y Nombre de la Madre, Padre o Tutor

Fecha

Nombre del Testigo No 1 _____

Dirección: _____

Relación que tiene con el paciente: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Nombre del Testigo No 2 _____

Dirección: _____

Relación que tiene con el paciente: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Recibí copia de este consentimiento (Firma y Fecha)
