



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

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR INDUCIBLE
 EN HIPOXIA 1α EN CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE
 PERIFÉRICA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS DURANTE CRISIS
 ASMÁTICA Y POSTERIOR A SU CONTROL

TESIS

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

PRESENTA:

Dr. Christian Rodrigo Alcocer Arreguín

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Guillermina Juliana Baay Guzmán

TUTOR DE TESIS

Dra. Blanca Estela del Río Navarro



MÉXICO D.F. Febrero del 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

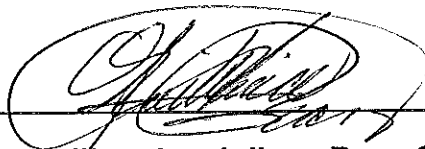
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

DRA. REBECA MARÍA GÓMEZ CHICO VELASCO

Directora de Enseñanza y Desarrollo Académico

Hospital Infantil de México Federico Gómez

DIRECTOR DE TESIS



Dra. Guillermina Juliana Baay Guzmán

Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas

Hospital Infantil de México Federico Gómez.

TUTOR CLÍNICO Y METODOLÓGICO



Dra. Blanca Esthela del Río Navarro

Jefa del Departamento Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica

Hospital Infantil de México

TUTOR CLÍNICO

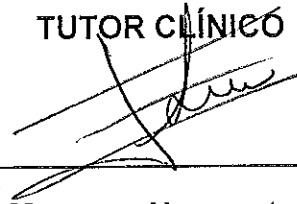


Dr. Jaime Del Río Chivardi

Médico Adscrito Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica

Hospital Infantil de México Federico Gómez.

TUTOR CLÍNICO



Dra. Elsy Maureen Navarrete Rodríguez

Médico Adscrito Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica

Hospital Infantil de México Federico Gómez.

GUÍA DE CONTENIDOS

I. Introducción	5
II. Marco Teórico	6
III. Antecedentes	17
IV. Plantamiento del problema	18
V. Pregunta de investigación	19
VI. Justificación	20
VII. Objetivos	21
VIII. Hipotesis	22
IX. Material y métodos	23
X. Plan de analisis estadístico	24
XI. Descripción de variables	24
XII. Resultados	27
XIII. Discusión	30
XIV. Conclusion	32
XV. Cronograma de actividades	33
XVI. Limitación del estudio	34
XVII. Referencias	35
XIII. Anexos	38

II. INTRODUCCION

El asma es un trastorno inflamatorio crónico de la vía aérea en el cual muchas células y elementos celulares juegan un papel importante. La inflamación crónica esta asociada con hiperrespuesta de la vía aérea que lleva a episodios recurrentes de sibilancias, falta de aire, dolor torácico y tos. Estos episodios están usualmente asociados a obstrucción importante de vías aéreas, con flujo de aire variable en el pulmón, con frecuencia es reversible ya sea espontáneamente o con tratamiento (1).

El asma es catalogada por La Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las principales enfermedades crónicas considerándose como un problema de salud pública (2).

El asma es una de las enfermedades crónicas más frecuentes, se estima una prevalencia de 300 millones de personas en todo el mundo que padecen asma, con al menos 250, 000 muertes anuales atribuidas a la enfermedad.

En México, se calcula que al menos del 6- 12% de los niños sufren de asma y estas cifras se han mantenido a la alza, con mayor predominio en el grupo de escolares. En los reportes de la Dirección General de Epidemiología de México de casos nuevos de asma en el 2014 fue de 1,952,434 en todo el país. (3)

En el Hospital Infantil de México en el 2014 se realizó la determinación del factor de transcripción inducible en hipoxia 1α (HIF- 1α) en pacientes pediátricos con asma, donde se demostró que la expresión de HIF- 1α se encuentra incrementado en células mononucleares de sangre periférica, tanto en el citoplasma como en el núcleo en pacientes con asma comparados con pacientes sanos y aún más incrementado en pacientes con crisis asmática, sugiriendo la importancia de ese factor en la patogenia de la enfermedad (3).

III. MARCO TEÓRICO

El asma

Se estima que 300 millones de personas sufren de asma, con 250.000 muertes anuales atribuidas a la enfermedad y con un estimado para el 2025 habrá más de 400 millones de asmáticos en el mundo. (1)

El asma puede cursar con atopia, la cual es manifestada como la presencia de pruebas cutáneas positivas, o la respuesta clínica a los alérgenos ambientales. La hiperreactividad bronquial es una respuesta bronco-constrictora aumentada en respuesta a un estímulo de las vías aéreas, siendo una característica importante dentro del asma, junto con la limitación del flujo aéreo variable y la inflamación de las vías aérea (4).

De acuerdo a datos de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud en México, en el 2014 se reportó un total de 1,952,434 de casos de asma y estado asmático, lo cual traduce una tasa de incidencia de 1,596 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, con mayor predominio entre los 1-4 años de edad (3).

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE GRAVEDAD				
	INTERMITENTE	LEVE PERSISTENTE	MODERADO PERSISTENTE	GRAVE PERSISTENTE
Síntomas	Menos de 1 vez a la semana	Más de una vez a la semana pero menos de una vez al día	Diarios	Se presentan Diarios
Exacerbaciones	Cortas	Pueden Afectar actividad diaria y el sueño	Pueden Afectar actividad diaria y el sueño	Frecuentes, con limitación para actividades físicas
Síntomas Nocturnos	No más de 2 veces al mes	Más de 2 veces al mes	Más de 1 vez a la semana	Frecuentes
FEV1	≥80% del predicho	≥80% del predicho	60-80% del predicho	≤60% del predicho
PEF	Con variabilidad < 20%	Con variabilidad < 20-30%	Con variabilidad > 30%	Con variabilidad > 30 %

Global Initiative for Asthma 2006

DIAGNOSTICO

El asma cuenta con diversos criterios diagnósticos, siendo los criterios clínicos fundamentales para establecer la enfermedad. (2) Los síntomas son episódicos con datos de obstrucción de vía aérea ó presencia de hiperreactividad. (5) Dentro de los criterios clínicos que se deben abordar son los siguientes: sibilancias, dificultad respiratoria, opresión torácica, y tos cumpliendo con las siguientes especificaciones: presentación de más de 1 síntoma de los anteriores, con variaciones en su intensidad. Son frecuentes por la noche o al despertar. Se pueden presentar con el ejercicio, la risa, el aire frío y tras la exposición de alérgenos. Pueden estar asociados a infecciones virales. (2) Dentro de la exploración física si bien no brinda ningún hallazgo característico, si puede ser útil para descartar otra entidad. Dentro de las pruebas de gabinete, la espirometría y la flujometría continuan siendo de gran utilidad. (2)

CLASIFICACIÓN

Los pacientes asmáticos deben estar clasificados en grupos, de acuerdo a su gravedad y control, establecidas en las guías GINA y NAEPP ambas por sus siglas en inglés; Iniciativa Global del asma 2014 y el Programa Nacional para la Educación y la Prevención del Asma.

TABLA 2. CLASIFICACION POR CONTROL					
Control de Síntomas de Asma			Nivel de Control de Síntomas en Asma		
En las 4 semanas previas, el paciente ha presentado:			Bien Controlado	Parcialmente Controlado	No Controlado
Síntomas de asma durante el día por más de 2 veces a la semana	Si	No	Ninguno de estos	1-2 de estos	3-4 de estos
Despertares nocturnos debidos a asma	Si	No			
Necesidad de medicamento rescatador 2 veces por semana	Si	No			
Limitación de actividad debido al asma	Si	No			

Global Initiative for Asthma 2014

Exacerbación asmática

Las exacerbaciones del asma son episodios caracterizados por un aumento progresivo de los síntomas de dificultad respiratoria, tos, sibilancias u opresión torácica y disminución progresiva de la función pulmonar. Siendo Las infecciones virales implicadas en la mayoría (>80%) de exacerbaciones en niños. (2)

Pueden ser desencadenadas por múltiples factores etiológicos tales como agentes alérgicos, infecciones, humo de tabaco, contaminación, ejercicio, estrés, aire frío, medicamentos y cambios hormonales.

TABLA 3. CLASIFICACION DE EXACERBACIÓN ASMÁTICA		
LEVE Ó MODERADA	GRAVE	PELIGRO PARA LA VIDA
Habla con frases cortas, prefiere estar sentado o recostado, no está agitado	Habla con palabras aisladas, se sienta inclinado hacia delante, está agitado	Somnoliento, confusión y tórax silente
Aumento de la FR	FR > 30 x min	
No utiliza musculatura accesoria	Uso de musculatura accesoria	
FC 100-120 x min	FC > 120 x min	
SatO2 90-95%	SatO2 < 90%	
PEF > 50% del valor predicho o del mejor personal	PEF < 50% del valor predicho o del mejor personal	
Global Initiative for Athma 2014		

FISIOPATOLOGÍA DE LA REMODELACIÓN DE LA VÍA AÉREA

Los pacientes con asma crónica presentan remodelación de la vía aérea, proceso en el cual se involucra una activación de muchas células estructurales, con cambios permanentes en las vías aéreas como consecuencia, que incrementa la obstrucción de la vía aérea y la hiperreactividad bronquial y disminuye la respuesta del tratamiento en el paciente.

Los cambios estructurales pueden incluir el engrosamiento de la membrana sub basal, fibrosis subepitelial, hipertrofia e hiperplasia del musculo liso, proliferación y dilatación de los vasos sanguíneos, y la hiperplasia e hipersecreción de las glándulas mucosas. La regulación del proceso

de reparación y de remodelamiento no está bien establecido, pero ambos el proceso de reparación y su regulación parecen ser eventos que explican la naturaleza persistente de la enfermedad y las limitantes a la respuesta terapéutica (5).

La remodelación de las vías aéreas ocurre en pacientes con múltiples problemas pulmonares, entre ellos, asma. Como se comentó anteriormente, existen cambios morfológicos en el epitelio de las vías aéreas siendo la característica clave para el remodelamiento en los pacientes asmáticos. Entre las alteraciones en los pacientes asmáticos incluye la pérdida del epitelio, con pérdida de las células ciliadas, hiperplasia de las células caliciformes, aumento en la producción de los factores de crecimiento, citosinas, y quimiocinas.

También se ha visto que existe disfunción de la barrera del epitelio en los paciente asmáticos siendo disfuncional, además exhibiendo una pérdida de la integridad de la función epitelial de unión, y todo esto acompañado de una reparación disfuncional.

La angiogénesis se ha visto tras el aumento en el número y el tamaño de la microvasculatura dentro del tejido bronquial en las vías aéreas remodeladas. Esto se ha visto debajo de la lamina basal, es decir entre la capa muscular y el parénquima que lo rodea. Existe un desbalance entre el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y la angiopoyetina-1, estando presentes en éstas anormalidades. El VEGF incrementa la permeabilidad de estos vasos sanguíneos anormales, con posterior edema por vasodilatación, lo cual contribuye a estrechamiento de la vía aérea. Además de realizar su labor de nutrición al tejido de las vías aéreas, estos vasos son la vía de entrada para todos los mediadores inflamatorios celulares derivados del plasma, y las citosinas.

Dentro de los mecanismos del remodelamiento de la vía aérea se incluye la inflamación como parte muy importante. Muchas citocinas, quimiocinas, y factores de crecimiento se liberan de células inflamatorias y células que dan estructura a los tejidos de las vías aéreas, lo que conlleva a un señalamiento complejo que conduce a la remodelación aérea. Actualmente se cuenta con el conocimiento de la IgE y las células cebadas están implicadas en la respuesta aguda y los eosinófilos y las proteínas básicas asociadas a gránulos tienen cabida en la respuesta tardía, con las células T, particularmente las células Th2, orquestando estas respuestas mediante la producción de citosinas, tales como la IL-4, IL-5, IL-9, y la IL-13. Se conoce que los asmáticos presentan un fenotipo que incluye mayormente a la respuesta Th2, cuyas citocinas son esenciales para la síntesis de IgE, producción de citocinas, eosinofilia aérea, hiperplasia del músculo liso, y la producción de

secreciones. Por otro lado se conoce que las células Th1 tienen un cierto rol protector ante éste proceso inflamatorio, pues al secretar IFN- γ inhibe la proliferación de células Th2.

Otro punto importante dentro de la remodelación es sin duda la presencia de los eosinófilos. Éstos constituyen la mayor fuente de citosinas profibróticas tal como TGF- β , jugando un rol importante en la remodelación. Así mismo los eosinófilos aumentan la proliferación de los fibroblastos, la síntesis de colágeno, y la maduración de los miofibroblastos. Se ha visto en las vías aéreas de los sujetos asmáticos, la IL-3, el GM-CSF, y eotaxinas 1, 2 y 3 que llevan al desarrollo de eosinófilos de los precursores CD34+ en la médula ósea, donde la IL-5 aumenta su maduración y su reclutamiento en las vías aéreas. Así mismo, los eosinófilos son productores de proteínas básicas de gránulos, como los eicosanoides, cisteinil leucotrienos, las especies reactivas de oxígeno que dañan a los tejidos, y un rango de citosinas y quimiocinas.

La lesión epitelial se describe como el daño a la capa epitelial en pacientes asmáticos, se cree que está asociado con un problema en el proceso de reparación que conduce a la inflamación y a respuestas de remodelación en la mucosa subyacente. Existen factores ambientales, o de estrés mecánico resultando del daño epitelial, que pueden estimular la liberación de los mediadores desde el epitelio, que contribuye a la remodelación del tejido. Los mediadores que se han visto implicados en el desarrollo de fibrosis subepitelial y el incremento de la masa de músculo liso de la vía aérea han sido TGF- β y quimiocinas, que son liberadas desde el epitelio que presenta daño, ó que está en reparación en respuesta a mediadores inflamatorios, tal como la IL-13.

Otros mediadores inflamatorios, citocinas, quimiocinas, y factores de crecimiento son liberadas por células inflamatorias y estructurales, y se ha visto que son clave en el inicio y la sincronización de la remodelación. Dentro de las citosinas identificadas como profibróticas (TGF- β e IL-11) las citosinas Th2 (IL.4, IL-9, IL-13, y la IL-5), las citosinas Th17 (IL-17A, IL-17F, e IL-17E), quimiocinas derivadas de epitelio (RANTES, proteína 1 α inflamatoria del macrófago, IL-8, eotaxina, y MMP).

Dentro de la historia natural de la remodelación de la vía aérea, se ha demostrado que en los pacientes asmáticos presentan una disminución de la función pulmonar con mayor medida que en sujetos sanos, y esto es proporcionalmente relacionado a la duración y gravedad de la enfermedad. A pesar de una evidencia clara de cambios inflamatorios que comienzan en etapas tempranas, tal como se ha demostrado que la sibilancia en los niños, el inicio de la remodelación de las vías aéreas en los pacientes asmáticos no ha sido bien caracterizada.

Dentro de la fibrosis subepitelial, los fibroblastos tienen un papel preponderante en este proceso. Los fibroblastos son 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 proteínas de la matriz extracelular, incluyendo colágena I, III y V. El compartimiento de la matriz extracelular de la vía respiratoria es dinámica, lo que refleja el saldo neto de la síntesis y la degradación, que está regulado por la acción de metaloproteinasas de la matriz y por inhibidores de metaloproteinasas. Sin embargo, un cambio en este equilibrio hacia el aumento de la matriz da como resultado fibrosis, lo que lleva a la anormalidad y alteración de la estructura y de las propiedades mecánicas. En clínica, los pacientes asmáticos presentan susceptibilidad a lesión y las respuestas de reparación aberrante dan como resultado la activación persistente de los fibroblastos, lo que lleva a la fibrosis subepitelial.

Para el aumento de la masa muscular, las células musculares constituyen las principales células estructurales dentro de los bronquios, y su incremento es la principal causa 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 causa hipertrofia. Además de los cambios estructurales, las células de músculo liso participan en el proceso inflamatorio y de remodelación a través de la expresión de moléculas de adhesión celular, receptores de citoquinas, quimiocinas (RANTES, eotaxina, proteína inflamatoria de macrófagos 1a, y la IL- 8) y por activación de receptores tipo Toll. La expresión en la superficie de las moléculas de adhesión por las células de músculo liso podría ser crucial en la regulación de las interacciones de una gran variedad de células inflamatorias (6).

FACTOR INDUCIBLE DE HIPOXIA

La homeostasis de oxígeno en mamíferos es regulada estrechamente, con la necesidad de mantener suficientes niveles de oxígeno dependiente para procesos críticos, mientras existe la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que son capaces de causar daño oxidativo al ADN, lípidos y proteínas.

En un estado de hipoxia, donde la demanda de oxígeno excede el abastecimiento, una respuesta fisiológica se monta la cual incrementa la capacidad de la sangre de llevar oxígeno a los tejidos, alterando el metabolismo celular, tal como la producción de ATP. Los factores inducibles de hipoxia son reguladores transcripcionales de las respuestas hipóxicas tanto en adultos como en organismos

embrionicos (7). En condiciones hipóxicas cuando los niveles de oxígeno bajan más de un 8-10% basal y la hidroxilación es inhibida, las subunidades HIF-1 α son estabilizadas, y éstas subunidades se unen a los elementos de respuesta a hipoxia en genes blancos del HIF-1 α , en asociación con co-activadores transcripcionales, para posteriormente encender estos genes (8).

En la vasta cascada de señalamientos, los factores inducibles de hipoxia (HIF) son particularmente importantes para la adaptación de organismos aerobios a bajas concentraciones de O₂. HIF-1 y HIF-2 modulan la transcripción de varios cientos de estos genes involucrados en la regulación de la homeostasis del oxígeno en los mamíferos, activando mediante transcripción la expresión de numerosos genes blanco, los cuales están involucrados en la eritropoyesis, metabolismo del hierro, regulación vascular, ingesta de glucosa, glicolisis, así otros varios procesos biológicos; así como el mantenimiento de las células madres y la embriogénesis, preconditionante de isquemia y del desarrollo de cáncer (8-12).

En 1991, el elemento control de ADN sensible a O₂, que confiere respuesta en el humano al gen de la glicoproteína de la eritropoyetina (EPO) fue identificado en su región lateral número 3. Con análisis posteriores de este elemento sensible a hipoxia, se identificó una proteína de unión de factor nuclear kDa, mostrando un aumento por la hipoxia y así fue llamado factor inducible de hipoxia 1 (HIF-1) (13).

HIF está compuesto por dos proteínas hélices bucle hélice básicas (bHLH), HIF - α y HIF- β , de la familia PAS. El dímero HIF α , β se une al motivo ADN core (G/ACGTG) en elementos de respuesta a hipoxia que están asociados con un amplio rango de genes involucrados en la respuesta hipóxica. Hay 3 subunidades α : HIF-1 α y HIF-2 α heterodimeriza con HIF- β para formar HIF1 y HIF2 como factores de transcripción, donde HIF-3 α aún es desconocida su función (11;14). La estructura de HIF 1 está compuesta de la subunidad HIF-1 α de 120-kDa complementada con una subunidad HIF- β de 91 a 94-kDa. HIF-1 α esta localizado en el cromosoma 14q21-q24 (15).

Se han descrito una gran cantidad de genes humanos que se han visto directamente regulados por HIF y se predice que pueden haber cerca de 200-300 blancos de HIF en el humano. Los genes regulados mediante HIF juegan un papel central en ambas respuestas sistémicas de hipoxia, tales como la proliferación, angiogénesis, eritropoyesis, y respuestas intracelulares, tales como la regulación de la glicolisis (16).

Se han identificado múltiples vías celulares las cuales están reguladas mediante HIF, incluyendo su cooperación con otros factores de transcripción y regulación de expresión de RNAm que pueden ser

cruciales para ambos, anti y pro estrategias hipóxicas. Ambas isoformas de HIF pueden aumentar la expresión de VEGF, donde HIF-1 disminuye la expresión de IL-8 mediante la inhibición del factor de transcripción Nrf2, y HIF-2 aumenta la expresión de IL-8 en una vía independiente de Nrf2, pero aumenta la actividad mediante la vía SP-1 (17).

La hipoxia activa la vía del HIF mediante un mecanismo sofisticado que regula las modificaciones post traductoras de las subunidades α . En este mecanismo, dos cambios moleculares independientes pero co-regulados pueden ser reconocidos: el primer cambio controla la abundancia de HIF- α donde el segundo regula su actividad transcripcional. Mediante la activación por la señal de hipoxia, HIF- α transloca al núcleo, dimeriza con HIF- β , recluta CBP/p300, e induce la expresión de sus blancos transcripcionales mediante la vía de unión a elementos que tiene respuesta a hipoxia.

La transcripción está regulada mediante las vías Proteín quinasa (Akt) y protein quinasa asociada a mitógeno (Erk), e inhibidas por proteínas reguladoras de hierro IRP1/2, y también por moléculas reguladoras pequeñas, interactuando con los elementos reguladores del hierro en 5-URT de HIF-2 α mRNA. AMPc disminuye la producción de HIF- α , y también orquesta la respuesta celular a energía de estrés en una manera independiente de HIF (12).

La abundancia del HIF- α puede ser regulada mediante mecanismos dependientes o independientes de O_2 . Por una parte, la transcripción y la traducción de las subunidades α permiten para inducción casi espontánea de HIF por hipoxia, pero por otra parte requiere un mecanismo para destituir HIF- α en otro tiempo. En presencia de O_2 el total de los niveles de las subunidades α son bajos debido a la degradación rápida mediante un mecanismo complejo con varios pasos distintos. Las enzimas que inician la degradación de HIF- α mediante hidroxilación son tanto dos prolinas en el ODDD (P402 y P564 y HIF- α) y son las proteínas de dominio hidroxilaza prolil. PH1, PH2 y PH3 son dominios catalíticos relacionados de manera cercana y pertenecen a la superfamilia de 2 oxoglutarato (2OG) oxigenasa dependiente. En orden a ser activos, las PHD requieren O_2 , el ciclo de ácido cítrico intermediario a 2OG como substrato, más Fe y ascorbato como cofactores. Un alto rango de cambio en las enzimas PHD pueden sugerir que la capacidad de hidroxilación para un factor de transcripción abundante bajo no sería limitante. Sin embargo, hay suficiente evidencia para el rol regulador clave de la actividad PHD en HIF- α que cambia y bajo condiciones cuando el HIF es inducido, la actividad PHD se vuelve limitada (18).

Existe evidencia que la proteína de unión a ARN HuR, no sólo eleva HIF-2 α , sino que parece ser crítico para el incremento compensatorio de la proteína HIF-1 α en las células y también afecta la expresión de gen dependiente de HIF-1 α en este sentido (19).

Las vías de acción del HIF-1 α son numerosas y complejas. Tiene acción en los ciclos celulares, el primero de ellos, se sabe que HIF-1 α indirectamente disminuye la actividad de ciclina E, y esa inhibición es la razón por la cual HIF-1 α causa una disminución o detención del ciclo celular. Los orígenes de esta acción en ciclina E continua siendo pobremente definida, aunque en algunas vías si lo es. La regulación de inhibidores de ciclinas, tales como p21 y p27, que son reportados. Sin embargo algunos estudios ha mostrado que la acción de HIF-1 α en p27 no es tan claro ya que la expresión de p27 bajo hipoxia puede ser independiente a HIF-1 α . El segundo efecto importante de HIF-1 α es la relación entre este factor y la ciclina D. Se ha estudiado el efecto estabilizador de HIF en los niveles de ciclina D. Se ha visto que la ciclina D después de 24 h al 0.2% la concentración de ciclina D en la población total celular disminuye un 50% comparado con condiciones normotóxicas. Para explicar la implicación de HIF-1, su actividad fue afectada por sobreexpresión de DN-HIF, que induce a un aumento de los niveles de ciclina D. También hay una acción de ciclina D en HIF-1 α , debido a la activación de HIF-1 proil hidroxilasa. Además, la activación de la expresión de ciclina D mediante HIF-2 marca la rivalidad en el crecimiento del tumor hipoxico y la progresión entre HIF-1 y HIF-2 (20). La angiogénesis consiste en el desarrollo de nuevos vasos a partir de una red vascular preexistente y tiene un papel preponderante en los diversos mecanismos fisiopatológicos benignos (cicatrización, heridas, isquemia, retinopatía diabética) y malignos (crecimiento del tumor y metástasis); el VEGF desempeña un papel fundamental en la angiogénesis y está regulado por el HIF (21). Existen evidencias de que los vasos tumorales son desorganizados y sin estructura adecuada para la circulación, lo que conduce frecuentemente al colapso. Dado que el crecimiento tumoral requiere oxígeno, nutrientes y una función metabólica apropiada para su desarrollo, es necesario promover los factores de la angiogénesis para inhibir la apoptosis de las células tumorales desencadenadas por la hipoxia. La angiogénesis da por lo tanto respuesta a la hipoxia tumoral, la cual está mediada por el HIF-1 α (22;23). Por lo tanto también la inhibición de HIF-1 α se convierte en un marcador terapéutico para la angiogénesis tumoral (21).

Existen reportes respecto a los efectos de HIF-1 α en el cerebro posterior a lesión isquémica, sin embargo en modelo murino con daño cerebral isquémico neonatal, mediante la inhibición de HIF-1 α mediante 2 ME se obtuvieron resultados con disminución en el edema cerebral y disminución del volumen de infarto a este nivel (24).

También se ha visto en pacientes con destrucción de cartílago en osteoartritis mediada por enzimas catabólicas y muerte de condrocitos incluyendo apoptosis y/o autofagia donde la expresión tanto de HIF-1 α y HIF-2 α se encuentran elevados mediante la respuesta de condrocitos a la hipoxia (25).

Se ha demostrado una expresión de HIF-1 α aumentada alrededor de 53% de los tumores, incluidos el de colon, gástricos, pancreáticos, pulmón, ovario, próstata, renal, melanoma y glioblastoma. El aumento de su expresión está asociado a una supervivencia más corta en el cáncer de mama y de útero, y a la mala respuesta al tratamiento en el cáncer nasofaríngeo, resaltando el papel de la hipoxia tumoral en el pronóstico. En el cáncer de próstata, se encuentra expresado en los estadios iniciales de la carcinogénesis y esa expresión está relacionada con los indicadores de diagnóstico y pronóstico para la metástasis, pudiendo ser el HIF-1 un biomarcador para el pronóstico (22).

Su importancia en la progresión tumoral lo convierte en un blanco plausible en las estrategias de quimio prevención, y también en la capacidad de inhibir la angiogénesis. Se ha demostrado en estudios de cáncer de próstata de modelo murino que existe sobreexpresión de HIF-1 α y que está asociado con un mayor crecimiento y potencial metastásico. También en estudios en humanos se ha visto mayor expresión de HIF-1 α en tumores de próstata. De hecho, el cáncer de próstata es de los tumores que más muestra incidencia de HIF-1 α , así como tumores en colon, gástrico, páncreas, pulmón, ovario, útero, próstata, gliomas, mama, en cabeza y cuello y melanoma (22;26).

El incremento de la actividad de HIF-1 α durante la tumorigénesis está bien documentada, parece ser una característica común en el cáncer. Como consecuencia, este factor se ha convertido en un nuevo blanco terapéutico. En algunos casos, los niveles elevados son simplemente debidos a la hipoxia crónica mediada por las células tumorales. En otros casos, las mutaciones genéticas inducen a la estabilización de HIF-1. Esto sucede en el caso de carcinoma renal claro. Como consecuencia, por la misma presión de oxígeno, HIF-1 tendrá un nivel elevado en las células cancerígenas que en las células normales. En general, se ha visto relación entre la agresividad de los cánceres debido a la inducción de los genes anti-apoptóticos y los pro-apoptóticos. Segundo, media la entrada de células proliferativas, las cuales inducen quimioresistencia dependiente de hipoxia (20).

El sistema HIF ha aumentado su importancia por el desarrollo de procesos fisiológicos y en el sistema cardiovascular: con modelos nocaout de HIF-1 α y HIF-2 α son letales debido a sus defectos en el sistema cardiovascular durante el desarrollo embriogénico. La progresión de la placa

ateroesclerótica es influenciada por hipoxia y especialmente por el HIF-1 α . Los macrófagos han mostrado un papel pivote en la patogénesis de la aterosclerosis y otras enfermedades. Suelen vivir en sitios de hipoxia de la placa y expresan grandes cantidades de HIF-1 α y de HIF-2 α bajo estas condiciones. En contraste con otras células, los macrófagos son de las pocas células que expresan ambos, HIF-1 α y HIF-2 α , pero no HIF-3 α . Se ha visto que los elementos del sistema HIF están involucrados en la regulación crucial de funciones en el macrófago. Esto incluye la remodelación vascular, la supervivencia celular, la adhesión leucocitaria, y la ingesta de lípidos (27).

HIF-1 siendo como blanco terapéutico, se ha visto mediante la administración de 2-ME, que se puede prevenir la patogenia del asma en modelo murino con asma atópica. De esta manera existe una disminución marcada de respuesta inflamatoria pulmonar, infiltración eosinofílica en el tejido pulmonar, hiperplasia de células caliciformes con oclusión en las vías aéreas con moco y reducción en la expresión de colágeno tipo IV. Por lo tanto, 2-ME también disminuye concomitantemente la expresión de HIF-1 u de VEGF en los mismos tejidos (27;28). Así mismo se ha visto que la exposición a alérgeno aumenta la expresión de HIF-1 α y de VEGF en biopsias endobronquiales y en células de lavados broncoalveolares en pacientes con asma y en pacientes con rinitis (27;29). También se ha visto aumento de HIF-1 α y de CCL2 en células epiteliales de lavado bronquial y tejido pulmonar de pacientes asmáticos después de la exposición al alérgeno (27;30), y con la disminución de HIF-1 α en células mieloides, que se incluyen eosinófilos, macrófagos, neutrófilos y células cebadas, lleva a una disminución en las respuestas del musculo liso a estímulos alérgicos (27;31).

III. ANTECEDENTES

El factor inducible de Hipoxia ha demostrado una amplia gama de respuestas fisiológicas frente al daño, tanto en condiciones isquémicas, hipóxicas e inflamatorias. Así mismo se ha visto que la expresión de VEGF en las vías respiratorias se correlacionó con el grado de angiogénesis y a su vez con la inflamación, sugiriendo que la producción excesiva de VEGF en las vías respiratorias de los pacientes con asma contribuye a una mayor infiltración de células inflamatorias. Así mismo se ha informado que la expresión de VEGF está incrementado en las vías respiratorias de los pacientes asmáticos en comparación con los sujetos control, y se correlaciona mayormente con el grado de inflamación de las vías respiratorias de los asmáticos. Así mismo, los niveles de expresión de HIF-1 y HIF-2 son mayores en pacientes asmáticos.

En el Estudio realizado en el Hospital Infantil de México de Huerta-Yepey et al, fueron examinados ratones modificados genéticamente para no expresar el gen HIF-1 β valorando su habilidad de montar respuesta inflamatoria alérgica en el pulmón posterior a exposición al alérgeno ovoalbúmina, midiendo niveles de HIF-1 α en biopsias endobronquiales y secreción bronquial en pacientes con asma y secreción nasal en pacientes con rinitis alérgica después del reto, encontrándose disminución de respuesta inflamatoria y producción de IgE total e IgE específica para ovoalbúmina. Por último, los niveles de HIF-1 α y de VEGF se incrementaron a nivel del tejido pulmonar y secreción bronquial en pacientes con asma y en la secreción nasal de pacientes con rinitis posterior al reto.

En un estudio previo Huerta-Yepey et al, se realizó la determinación de HIF-1 α mediante la técnica de inmunocitoquímica en células mononucleares de sangre periférica para la determinación de este factor de transcripción en pacientes con asma. Se demostró la expresión del factor de transcripción inducible en hipoxia 1 α nuclear se encuentra aumentado en células mononucleares de sangre periférica en pacientes con asma y aún más incrementado en pacientes con crisis asmática comparados en pacientes sanos, dando la posibilidad de ser un factor importante en la patogenia de la enfermedad, sin embargo quedaba el interés por conocer otras variables clínicas que intervengan en el incremento del porcentaje de expresión de este factor de transcripción.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El asma, al ser una enfermedad crónica con tendencia a mayor prevalencia a nivel mundial y en nuestro país en los últimos estudios epidemiológicos, es considerado un problema de salud pública importante.

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 nivel de gravedad de la enfermedad, ya que se vio un cambio en la expresión de HIF en ratones sensibilizados tras la exposición de alérgeno con aumento de $10 \pm 1.1\%$ en área perivascular, $15.2 \pm 5.2\%$ en área perobronquial, y $26.5 \pm 4.1\%$ en el intersticio comparado con ratones sanos. Se cuenta también con el antecedente que la expresión de HIF-1 α y VEGF incrementa en pacientes alérgicos adultos después de la exposición al alérgeno, así mismo se ha visto la presencia de HIF-1 con un papel preponderante en niños con crisis asmática por lo que se puede correlaciona con la gravedad de esta enfermedad.

En un estudio previo en este Hospital, se realizó la determinación de HIF-1 α mediante la técnica de inmunocitoquímica en células mononucleares de sangre periférica para la determinación de este factor de transcripción en pacientes con asma. Se demostró la expresión del factor de transcripción inducible en hipoxia 1 α nuclear se encuentra aumentado en células mononucleares de sangre periférica en pacientes con asma y aún más incrementado en otros pacientes durante exacerbación de crisis asmática comparados en pacientes sanos.

Por ello, nuestro interés se centra en evaluar la expresión del factor de transcripción inducible en hipoxia 1 (HIF-1) en pacientes pediátricos durante su crisis y durante su control, ya que no existen estudios previos que analicen la expresión de HIF-1 α en pacientes asmáticos durante una exacerbación y posterior durante su control clínico. Esto nos llevará a determinar la presencia de este factor de transcripción y su comportamiento en las distintas etapas de control de los pacientes pediátricos con asma.

V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la diferencia en los niveles de factor de transcripción Inducible en Hipoxia 1 (HIF-1) en pacientes con crisis asmática y posterior a su control?

VI. JUSTIFICACIÓN

La gran mayoría de los tratamientos médicos actuales empleado para el asma supone una mejoría de síntomas y un estado antiinflamatorio durante la administración del mismo. Sin embargo, no existen tratamientos que inhiban de alguna manera la respuesta e hipoxia que llevan a cambios estructurales irreversibles provocados por la remodelación pulmonar, aunque en el presente estudio no se contempla idear algún tratamiento en los pacientes asmáticos.

Es necesario conocer los niveles y la expresión de HIF-1 en todas las etapas del asma de acuerdo a sus clasificaciones por gravedad y por control, para ser comparados con controles sanos. Esto nos llevará a entender mejor el papel del HIF-1 en la remodelación de la vía aérea y en general la fisiopatogénia en el asma en los diferentes grupos pediátricos clasificados según su gravedad y control, sin embargo este trabajo no proyecta dar datos de remodelación de vías aéreas.

Como finalidad, se espera un mayor entendimiento del comportamiento de la expresión de HIF-1 en pacientes asmáticos en todas sus facetas de gravedad y control y en un futuro proponer blancos terapéuticos que inhiban la expresión de este factor de transcripción así como proponer nuevos y mejores factores pronósticos.

VII. OBJETIVOS

General

Comparar los niveles de factor de transcripción HIF-1 en pacientes asmáticos con crisis y posterior a su control.

Específicos

Medir los niveles de factor de transcripción HIF-1 en células mononucleares purificadas de sangre periférica de pacientes pediátricos con asma en crisis

Medir los niveles de factor de transcripción HIF-1 en células mononucleares purificadas de sangre periférica de pacientes pediátricos con asma controlado

Relacionar los niveles de factor de transcripción HIF-1 en células mononucleares purificadas de sangre periférica de pacientes pediátricos asmáticos con la gravedad de la enfermedad.

VIII. HIPOTESIS

Los niveles de factor de transcripción HIF-1 en pacientes asmáticos con crisis disminuyen en un 20% posterior al control.

IX. MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio de cohorte prospectiva

VARIABLES

Variable dependiente:

HIF-1: Factor inducible de hipoxia -1 proteína de transcripción presente en condiciones de hipoxia.

Unidad de Medición: Porcentaje

Tipo de Variable: Numérica continua

Variable independiente:

Crisis Asmática: Asmáticos con exacerbación de síntomas de manera aguda tras exposición a factor desencadenante.

Unidad de medición: Porcentaje

Tipo de Variable: Categórica binomial

SITIO

El estudio se realizó en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) que es un hospital de tercer nivel de atención médica, que cuenta con un área de hospitalización y consulta externa de especialidades y sub-especialidades de pediatría y alergia pediátrica. Es un centro de referencia de pacientes con asma, que brinda métodos de detección, diagnóstico, tratamiento y seguimiento. Específicamente el estudio se realizó en el Departamento de Alérgia e Inmunología así como en la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas de dicha Institución.

POBLACION OBJETIVO

Pacientes asmáticos

POBLACION ELEGIBLE

Pacientes con crisis asmática que acudan al Servicio de Urgencias del Hospital Infantil de México Dr. Federico Gómez.

• **Criterios de inclusión**

- Pacientes de 6 a 17 años de edad con diagnóstico de asma de acuerdo a la guía GINA 2014
- Pacientes con crisis asmática
- Pacientes que acepten participar con firma de consentimiento y en su caso asentimiento informado

• **Criterios de no inclusión**

- Presencia de infección de vías respiratorias aguda

• **Criterios de eliminación**

- Pacientes que posterior a la crisis no acudan a seguimiento
- Pacientes en quienes no se cuente con información completa de la medición de HIF-1 durante la crisis y posterior a su control

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Cálculo del tamaño de muestra de 50 pacientes

MUESTREO

Se trata de un muestreo por conveniencia, eligiendo de forma consecutiva cada individuo accesible que cumpla los criterios de selección.

LOGÍSTICA

Se invitó a participar a todos los pacientes con asma que acuden al Servicio de Urgencias del HIMFG por presentar crisis asmática, previo consentimiento y en su caso asentimiento informado se realizara historia clínica así como exploración física completa aunada al tratamiento previamente establecido por el Servicio de Urgencias para el control de la crisis.

Se clasificó y anotó la gravedad de la enfermedad y del cuadro actual, se obtuvo muestra de sangre periférica la cual se envió a la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas para su procesamiento y medición de factor de transcripción HIF-1.

Posterior al control de los síntomas agudos, se inició tratamiento controlador de acuerdo a la guía GINA 2014.

Se citó al mes para verificar mejoría de síntomas, corroborar adecuado manejo de controlador y posteriormente a los 3 meses.

En la visita de 3 meses y posterior a corroborar que el asma se encuentre con adecuado control se procedió a tomar muestra de sangre periférica para medición de factor de transcripción HIF-1.

• **Consideraciones especiales**

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 multiplicara por el número de laminillas (Portaobjetos para microscopio esmerilados 25x75mm, Madesa® México) que se podrán preparar y se añadirá el PBS 1X suficiente para su preparación (10X10³ células en 100 μ l).

Ensayo de inmunocitoquímica

Con la finalidad de disminuir las variaciones entre experimentos, la reacción para la proteína HIF-1 α , se 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) y se calentó 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 veces por 10 minutos. Se bloqueó la unión inespecífica de los anticuerpos al tejido, mediante el uso de suero normal de cerdo al 2% en PBS 1X.

Posteriormente, las secciones se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal anti-HIF-1 α . Después de lavar las secciones de tejido se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado a biotina y posteriormente con streptavidina conjugada a HRP, por último el color se generó mediante la adición del sustrato diaminobenzidina (DAB) 2 minutos; la reacción se paró con agua 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 por cada laminilla, utilizando un analizador de imágenes (Image-Pro Plus®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

IMPLICACIONES ÉTICAS

El presente estudio cumple con lo estipulado en el título segundo del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud. Según esta ley vigente el estudio corresponde a la categoría I (investigación con riesgo mayor al mínimo), la información obtenida de los pacientes durante el estudio será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores participantes.

Previa inclusión al estudio se solicitó consentimiento y asentimiento informado a los todos los pacientes que cumplen con los criterios de inclusión.

XIII. RESULTADOS

Se recibieron 84 pacientes con crisis asmática en el Servicio de Urgencias del Hospital Infantil de Mexico Federico Gomez en el periodo de estudio, de los cuales 72 pacientes contaban con los criterios de inclusión y aceptaron participar en el estudio, además se incluyeron 55 controles sanos.

La edad promedio fue de 10.7 años \pm 2.4, el 43.7% eran hombres (IC 95% 35-52%) y el 56.3% mujeres (IC 95% 35-52%).

Al momento de la crisis, la media de la expresión de HIF total fue de 45.25 con una mediana de 47.50 y el HIF nuclear fue de 31.56 en promedio con una mediana de 17.

Al comparar los valores de HIF en pacientes con crisis asmaticos vs pacientes sanos se observo una diferencia estadisticamente significativa en estos valores ($p=0.000$) con una mediana de HIF total en controles de 20 y HIF nuclear de 1.

El seguimiento posterior a la crisis asmatica se realizo en un promedio de 3 meses encontrando una mediana de expresion de HIF total de 8 y HIF nuclear de 51.

En la comparación de los niveles de HIF total y HIF nuclear durante la crisis y posterior a esta se observó una diferencia estadisticamente significativa para ambos valores ($p=0.020$ y 0.003 respectivamente).

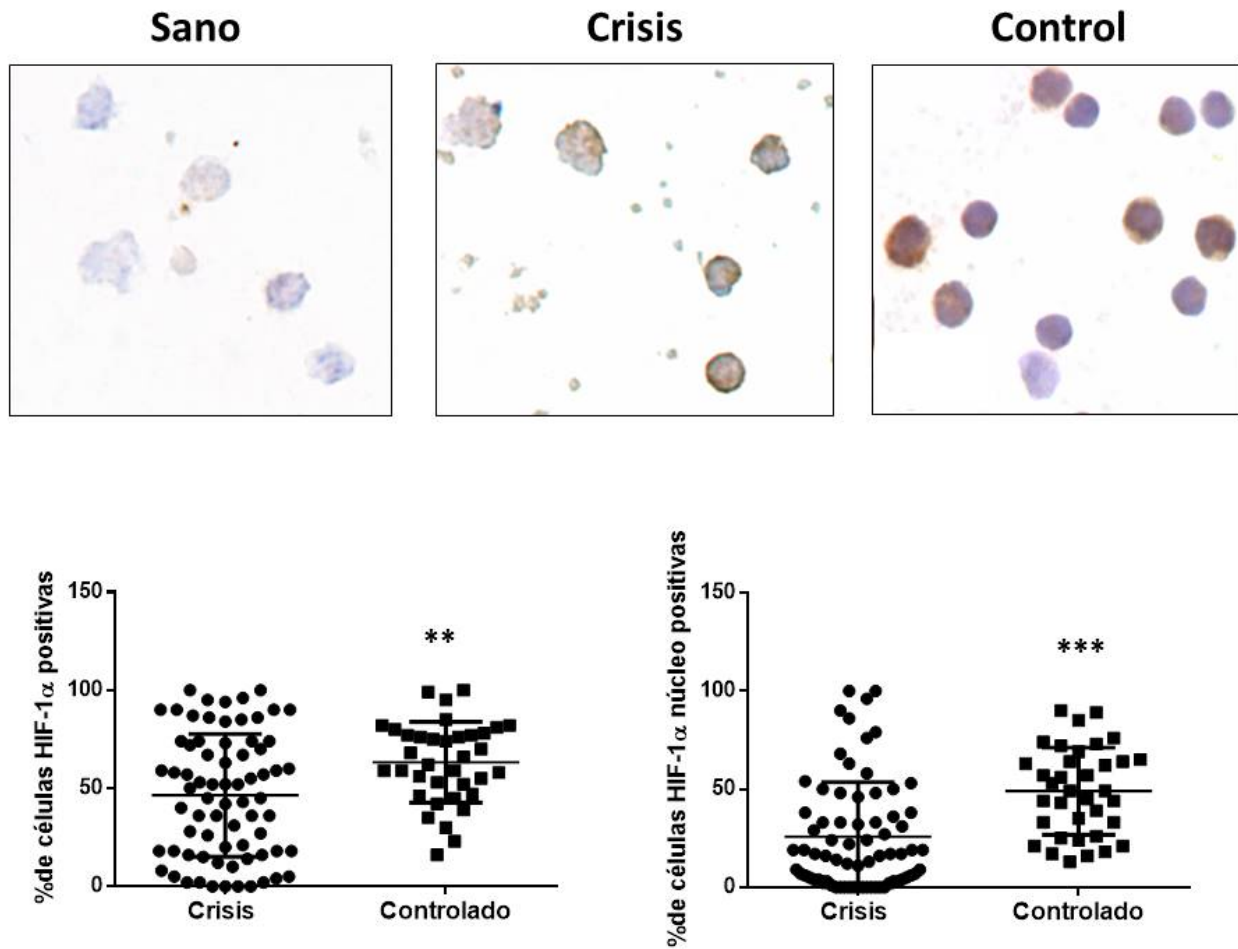


Figura 1. Incremento de la proteína HIF-1 α en células mononucleares de sangre periférica tras una crisis y después de su control.

De las células mononucleares de sangre periférica se realizaron tinciones de inmunocitoquímica para la proteína HIF-1 α . En el panel superior se muestran micrografías representativas la tinción en donde se puede observar que la existe una expresión basal de HIF-1 α en los sujetos sanos pero esta no es comparable en los pacientes asmáticos en crisis, los cuales muestran expresión de HIF-1 tanto en citoplasma como en núcleo pero este incrementa en las células después de su control en donde se observa una tinción nuclear principalmente.

En el panel inferior izquierdo se muestran el análisis del porcentaje de células HIF-1 α positivas, en donde se observa que los pacientes en control tienen mayor expresión de HIF-1 α en comparación con los sujetos en crisis y este es estadísticamente significativo $p=0.001$. De igual forma el análisis del porcentaje de núcleos positivos mostro que existe un incremento de esta proteína en los pacientes controlados en comparación con los pacientes en crisis y es estadísticamente significativo $p=0.0001$.

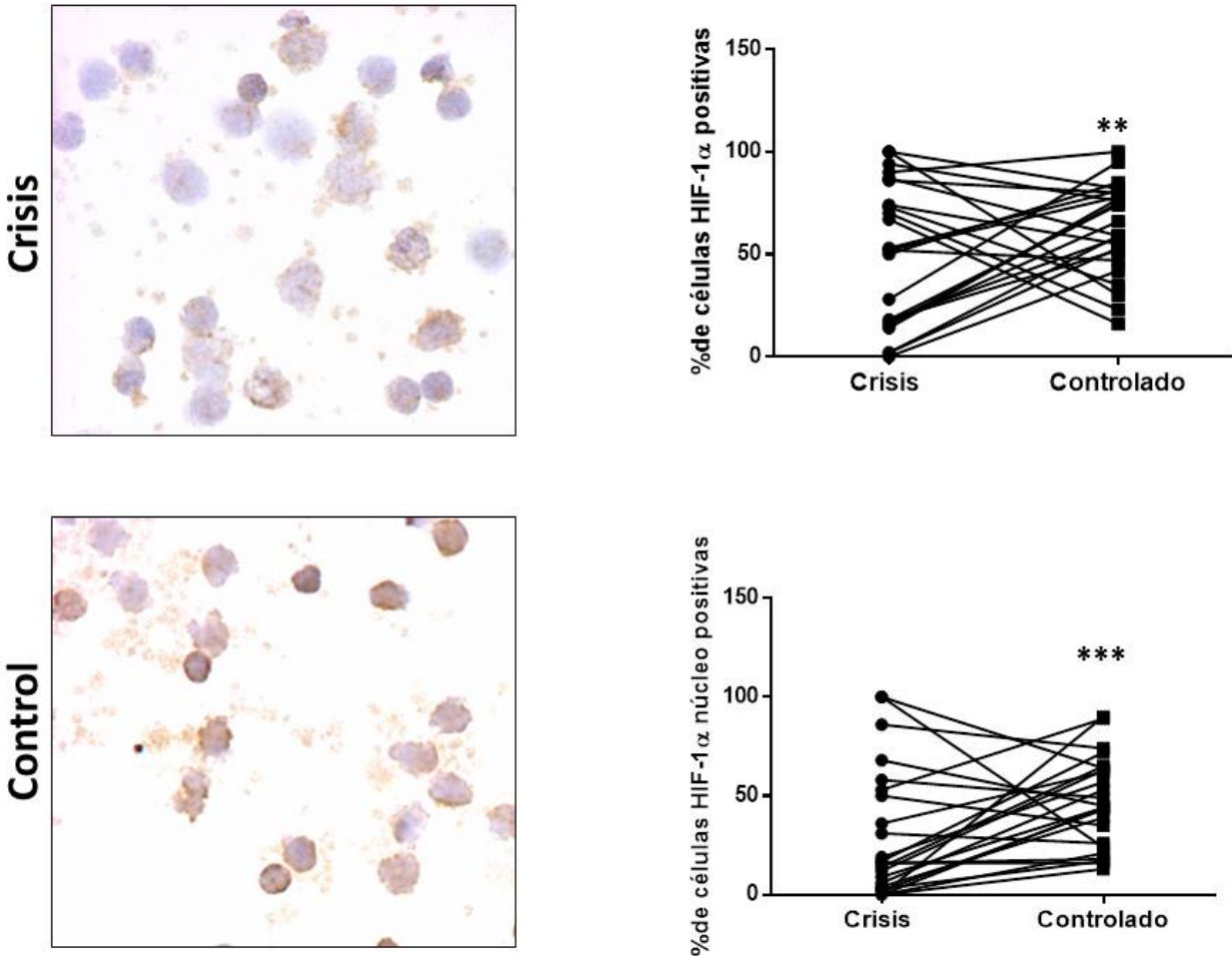


Figura 2. Seguimiento de la proteína HIF-1 α en células mononucleares de sangre periférica en los pacientes en crisis y tras su control.

En el panel izquierdo se muestran micrografías representativas la tinción de HIF-1 α del mismo paciente durante la crisis y posterior a su control, en donde se puede observar que la expresión es mayor y principalmente nuclear durante el control en comparación de la muestra obtenida durante la crisis. En el panel derecho se muestra la correlación de cada paciente durante la crisis y posterior a su control, en donde se muestra que la expresión de HIF-1 α incrementa en la mayoría de los pacientes tras su control en comparación con la crisis, sin embargo existen pacientes en los que esta proteína esta altamente expresada durante la crisis y disminuye tras su control.

XIV. DISCUSIÓN

El asma es una enfermedad crónica heterogénea, en donde la remodelación juega un rol muy importante como modificador morfológico de vías aéreas, entre las alteraciones principales en los pacientes asmáticos incluye la pérdida del epitelio, con pérdida de las células ciliadas, hiperplasia de las células caliciformes, aumento en la producción de los factores de crecimiento, citosinas, y quimiocinas (6).

La angiogénesis en los pacientes asmáticos es parte esencial puesto que el VEGF incrementa la permeabilidad de los vasos sanguíneos anormales, con posterior edema por vasodilatación, lo cual contribuye a estrechamiento de la vía aérea. Además de realizar su labor de nutrición al tejido de las vías aéreas, estos vasos son la vía de entrada para todos los mediadores inflamatorios celulares derivados del plasma, y las citosinas. (6)

Bajo condiciones de hipoxia mientras los niveles de oxígeno bajan menos de 8-10% y la hidroxilación es inhibida, la subunidad HIF-1 α es estabilizada y translocada al núcleo para unirse a la subunidad (beta) y de este modo se une a sus elementos de respuesta a hipoxia (ERH) de sus genes blanco, asociándose con co-activadores transcripcionales, para encender estos genes (8). El HIF-1 α al ser un factor de transcripción inicia con una vasta cascada de señalamientos, donde HIF-1 α es particularmente importantes para la adaptación de organismos aerobios a bajas concentraciones de O₂. HIF-1 y HIF-2 modulan la transcripción de varios cientos de estos genes involucrados en la regulación de la homeostasis del oxígeno en los mamíferos, activando mediante transcripción la expresión de numerosos genes blanco, los cuales están involucrados en la eritropoyesis, metabolismo del hierro, regulación vascular, ingesta de glucosa, glicolisis, así otros varios procesos biológicos; así como el mantenimiento de las células madres y la embriogénesis, preconditionante de isquemia y del desarrollo de cáncer (8-12).

Antecedentes de nuestro grupo de trabajo, que en un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar, en donde se demostró que la expresión de HIF-1 α correlaciona con el grado de gravedad y la expresión de VEGF, CCL2, CXCL12 que participan en la remodelación tisular del asma.(29) Estos resultados, motivaron al estudio de este factor de transcripción (HIF- 1 α) en humanos, en biopsias bronquiales y lavados bronquioalveolares de pacientes adultos con asma antes y después de un reto antigénico, observando que la expresión de HIF-1 α incrementa de manera significativa después del reto. Esto coorelaciona con lo reportado por el grupo de Lee que reportó que tanto HIF-1 α y HIF-2 α se encuentran elevados en biopsias obtenidas por broncoscopia de pacientes

asmáticos en comparación con los controles, con una importante correlación con el factor de crecimiento del endotelio vascular, que se relaciona con la remodelación de la vía aérea.

En nuestro estudio, se incluyeron pacientes pediátricos con crisis asmática y posterior en su control y sanos como control, con una media de edad de 9 años, se analizó la expresión del factor inducible en hipoxia- 1 α , se realizó la determinación por medio de inmunocitoquímica en células mononucleares de muestra de sangre periférica.

Nuestro estudio arrojó evidencia de expresión de HIF en individuos tanto asmáticos en crisis como durante su control con niveles de expresión altos tanto , sin embargo con niveles de expresión más elevados en los pacientes durante su control. Se encontró una diferencia estadística con $P= 0.001$ en el porcentaje total de HIF-1 α en los pacientes con crisis, y así mismo una diferencia significativa entre los niveles de expresión a nivel nuclear entre los pacientes en crisis y posterior en su control con $P= 0.0001$.

Los pacientes pediátricos que con criterios de inclusión al estudio según su clasificación clínica de acuerdo a GINA supone que la expresión de HIF debería ser mayor en los pacientes con crisis y los pacientes durante el control, sin embargo como se comentó existió una diferencia significativa con mayor predisposición a la expresión en pacientes asmáticos durante su control clínico.

La expresión del HIF- 1 α nuclear, es indicativa de que existe actividad transcripcional en el núcleo celular, siendo esta expresión con un papel más preponderante pues a este nivel de la célula existe mayor actividad de transcripción.

XV. CONCLUSIONES

El Factor inducible en hipoxia 1- α ha sido estudiado inicialmente como un factor de transcripción en enfermedades neoplásicas, sin embargo en estudios recientes se ha visto su interferencia en enfermedades alérgicas y en asma.

Se tiene entendido que este factor de transcripción tiene su actividad como factor pro-inflamatorio donde existen genes implicados que detonan la expresión de éste factor de transcripción con repercusión sobre todo en la remodelación de la vía aérea. Con la toma de muestra de sangre periférica es capaz de valorar la expresión de HIF-1 α en células mononucleares tanto en citoplasma como en el núcleo de las mismas, mediante la técnica de inmunocitoquímica, siendo una técnica poco invasiva.

Nuestros resultados demuestran hallazgos distintos a los esperados al principio del estudio, ya que se tenía contemplado el aumento en la expresión de HIF-1 α en los pacientes con crisis y posteriormente disminuir una vez que se encuentre bajo control clínico. Sin embargo, los resultados demuestran una mayor expresión de HIF-1 α en pacientes que presentan adecuado control clínico más no en crisis, aunque en algunos pacientes sí mostraron menor expresión de HIF- 1 α cuando presentaron la mejoría clínica, sin embargo fue la minoría.

Esto sugiere que, al tratarse de un problema crónico donde ya existe remodelación importante de vías aéreas, hay mayor cantidad de hipoxia tisular por lo que la expresión de HIF-1 α se encuentra aumentada, generando mayor remodelación y por ende mayor grado de hipoxia y de esta manera existe una retroalimentación positiva para la generación de HIF-1 α en pacientes con asma crónica que ya habían presentado crisis previamente.

En nuestro estudio, se realizó la determinación del HIF- 1 α mediante la técnica de inmunocitoquímica en células mononucleares de sangre periférica, la cual resulta en una intervención poco invasiva y técnicamente factible para la determinación de este factor en pacientes pediátricos con asma, para posteriormente valorar esta proteína como un posible blanco terapéutico, o inclusive como marcador de gravedad.

XVI. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	MES				
	2014		2015		
	Marzo Septiembre	Octubre- Diciembre	Enero- Febrero	Marzo- Abril	Mayo- Junio
Elección del tema	X				
Búsqueda de antecedentes	X				
Elaboración de protocolo	X				
Enlistar pacientes pediátricos con asma y sin asma, y en crisis asmática. Realizar su clasificación de la enfermedad		X	X		
Recolección de muestras de pacientes y envío a laboratorio de Investigación Enfermedades Oncológicas		X	X		
Análisis de resultados				X	X
Presentación de la información					X
Redacción de tesis					X

XVII. LIMITACIÓN DEL ESTUDIO

Se necesitan nuevos estudios para determinar el comportamiento de la expresión de HIF-1 α en pacientes asmáticos de acuerdo al tratamiento de mantenimiento que se esté administrando y a los niveles de saturación de oxígeno y estos parámetros sería conveniente relacionarlos con la cantidad de expresión de HIF-1 α .

XVII. REFERENCIAS

- (1) World Health Organization. *Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach, 2007.*
- (2) NHBI Global Strategy for Asthma Management and Prevention NHLBI/WHO Workshop Report: Global Initiative for Asthma 2014 (Update 2014)
- (3) 2015. http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/infoepid/inf_morbilidad_hist.html
- (4) Katial RK, Covar RA. Bronchoprovocation testing in asthma. *Immunol Allergy Clin North Am* 2012 Aug;32(3):413-31.
- (5) NAEPP, NHLBI, NIH. Expert Panel Report 3: Guidelines for the diagnosis and Management of Asthma. 2007.
- (6) Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011 Sep;128(3):451-62.
- (7) Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell Mol Life Sci* 2003 Jul;60(7):1376-93.
- (8) Martin-Rendon E, Snowden JA, Watt SM. Stem cell-related therapies for vascular diseases. *Transfus Med* 2009 Aug;19(4):159-71.
- (9) Cavadas MA, Nguyen LK, Cheong A. Hypoxia-inducible factor (HIF) network: insights from mathematical models. *Cell Commun Signal* 2013;11(1):42.
- (10) Li Q, Chen H, Huang X, Costa M. Effects of 12 metal ions on iron regulatory protein 1 (IRP-1) and hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-regulated genes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006 Jun 15;213(3):245-55.
- (11) Tennant DA, Gottlieb E. HIF prolyl hydroxylase-3 mediates alpha-ketoglutarate-induced apoptosis and tumor suppression. *J Mol Med (Berl)* 2010 Aug;88(8):839-49.
- (12) Zhdanov AV, Waters AH, Golubeva AV, Papkovsky DB. Differential contribution of key metabolic substrates and cellular oxygen in HIF signalling. *Exp Cell Res* 2015 Jan 1;330(1):13-28.
- (13) Deborah Stroka DC. *Signaling Pathways in Liver Diseases.* 2005.

- (14) Xia Y, Choi HK, Lee K. Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors. *Eur J Med Chem* 2012 Mar;49:24-40.
- (15) Philip J.S.Charlesworth ALH. *Angiogenesis*. 2008.
- (16) Kristina M.Cook CJS. *Angiogenesis*. 2008.
- (17) Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 versus HIF-2--is one more important than the other? *Vascul Pharmacol* 2012 May;56(5-6):245-51.
- (18) Kaluz S, Kaluzova M, Stanbridge EJ. Regulation of gene expression by hypoxia: integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element. *Clin Chim Acta* 2008 Sep;395(1-2):6-13.
- (19) Schulz K, Milke L, Rubsamen D, Menrad H, Schmid T, Brune B. HIF-1alpha protein is upregulated in HIF-2alpha depleted cells via enhanced translation. *FEBS Lett* 2012 Jun 4;586(11):1652-7.
- (20) Bedessem B, Stephanou A. A mathematical model of HIF-1alpha-mediated response to hypoxia on the G1/S transition. *Math Biosci* 2014 Feb;248:31-9.
- (21) Kamiyama H, Takano S, Ishikawa E, Tsuboi K, Matsumura A. Anti-angiogenic and immunomodulatory effect of the herbal medicine "Juzen-taiho-to" on malignant glioma. *Biol Pharm Bull* 2005 Nov;28(11):2111-6.
- (22) Fraga A, Ribeiro R, Medeiros R. [Tumor hypoxia: the role of HIF]. *Actas Urol Esp* 2009 Oct;33(9):941-51.
- (23) Galanis A, Pappa A, Giannakakis A, Lanitis E, Dangaj D, Sandaltzopoulos R. Reactive oxygen species and HIF-1 signalling in cancer. *Cancer Lett* 2008 Jul 18;266(1):12-20.
- (24) Chen W, Jadhav V, Tang J, Zhang JH. HIF-1 alpha inhibition ameliorates neonatal brain damage after hypoxic-ischemic injury. *Acta Neurochir Suppl* 2008;102:395-9.
- (25) Zhang FJ, Luo W, Lei GH. Role of HIF-1alpha and HIF-2alpha in osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 2015 May;82(3):144-7.
- (26) Kizaka-Kondoh S, Tanaka S, Harada H, Hiraoka M. The HIF-1-active microenvironment: an environmental target for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2009 Jul 2;61(7-8):623-32.
- (27) Poitz DM, Augstein A, Hesse K, Christoph M, Ibrahim K, Braun-Dullaeus RC, et al. Regulation of the HIF-system in human macrophages--differential regulation of HIF-alpha subunits under sustained hypoxia. *Mol Immunol* 2014 Feb;57(2):226-35.

- (28) Huerta-Yepe S, Baay-Guzman GJ, Garcia-Zepeda R, Hernandez-Pando R, Vega MI, Gonzalez-Bonilla C, et al. 2-Methoxyestradiol (2-ME) reduces the airway inflammation and remodeling in an experimental mouse model. *Clin Immunol* 2008 Nov;129(2):313-24.
- (29) Huerta-Yepe S, Baay-Guzman GJ, Bebenek IG, Hernandez-Pando R, Vega MI, Chi L, et al. Hypoxia inducible factor promotes murine allergic airway inflammation and is increased in asthma and rhinitis. *Allergy* 2011 Jul;66(7):909-18.
- (30) Baay-Guzman GJ, Bebenek IG, Zeidler M, Hernandez-Pando R, Vega MI, Garcia-Zepeda EA, et al. HIF-1 expression is associated with CCL2 chemokine expression in airway inflammatory cells: implications in allergic airway inflammation. *Respir Res* 2012;13:60.
- (31) Crotty Alexander LE, Akong-Moore K, Feldstein S, Johansson P, Nguyen A, McEachern EK, et al. Myeloid cell HIF-1alpha regulates asthma airway resistance and eosinophil function. *J Mol Med (Berl)* 2013 May;91(5):637-44.

XVIII. ANEXOS



Carta de consentimiento informado para pacientes

Proyecto de investigación:

Determinación de la expresión del factor inducible en hipoxia 1a en células minonucleares de sangre periférica en pacientes pediátricos durante crisis asmática y posterior a su control

Estimado madre y/o padre:

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

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

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

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

OBJETIVO DEL ESTUDIO

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

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

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

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

Las muestras serán obtenidas mediante el siguiente procedimiento:

Obtención de la muestra sanguínea.

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

RIESGOS Y MOLESTIAS

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

BENEFICIOS

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

COSTOS

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

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

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

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

Nombre y firma de la Madre

Nombre y firma del Padre

Nombre y firma de testigo 1

Nombre y firma de testigo 2

Parentesco con el paciente

Parentesco con el paciente

Nombre y firma del investigador

Responsable



Carta de asentimiento informado para pacientes con crisis asmática

Proyecto de investigación:

Determinación de la expresión del factor inducible en hipoxia 1a en células minonucleares de sangre periférica en pacientes pediátricos durante crisis asmática y posterior a su control

Estimado madre y/o padre:

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

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

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

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

OBJETIVO DEL ESTUDIO

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

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

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

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

Las muestras serán obtenidas mediante el siguiente procedimiento:

Obtención de la muestra sanguínea.

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

RIESGOS Y MOLESTIAS

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

BENEFICIOS

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

COSTOS

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

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

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

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

Nombre y firma del paciente _____

Nombre y firma de la Madre

Nombre y firma del Padre

Nombre y firma de testigo 1

Nombre y firma de testigo 2

Parentesco con el paciente

Parentesco con el paciente

Nombre y firma del investigador

Responsable

Carta de consentimiento informado para pacientes sanos



Proyecto de investigación:

Determinación de la expresión del factor inducible en hipoxia 1a en células minonucleares de sangre periférica en pacientes pediátricos durante crisis asmática y posterior a su control

Estimado madre y/o padre:

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

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

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

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

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

OBJETIVO DEL ESTUDIO

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

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

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

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

Las muestras serán obtenidas mediante el siguiente procedimiento:

Obtención de la muestra sanguínea.

1. Se explica detalladamente el procedimiento al paciente y/o familiar.

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

RIESGOS Y MOLESTIAS

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

BENEFICIOS

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

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

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

COSTOS

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

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

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

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

Nombre y firma de la Madre

Nombre y firma del Padre

Nombre y firma de testigo 1

Nombre y firma de testigo 2

Parentesco con el paciente

Parentesco con el paciente

Nombre y firma del investigador

Responsable
