



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina de León
División de Estudios de Posgrado



Instituto Mexicano del Seguro Social
Centro Médico Nacional La Raza
Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”

TESIS

Diferencia de la concentración de coestimulador inducible (ICOS) y su ligando (ICOS L) cuantificado por ELISA en suero de pacientes asmáticos alérgicos, asmáticos no alérgicos y pacientes sin asma

Para obtener el título en la especialidad de Alergia e Inmunología Clínica

Presenta:

Autor

Nombre: Marisol Rico Arroyo

Categoría: Médico residente del Hospital de Especialidades U.M.A.E La Raza

Tutor

Nombre: Martin Becerril Ángeles

Categoría: Jefe de Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital de

México D.F. Marzo del 2014



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.



Dirección de Prestaciones Médicas
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud



Dictamen de Autorizado

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud 3501
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA, D.F. NORTE

FECHA 11/03/2014

DR. MARTIN BECERRIL ANGELES

P R E S E N T E

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

Diferencia de la concentración de coestimulador inducible (ICOS) y su ligando (ICOS L) cuantificado por ELISA en suero de pacientes asmáticos alérgicos, asmáticos no alérgicos y pacientes sin asma.

que sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de Ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro
R-2014-3501-32

ATENTAMENTE

DR. (A). ERNESTO ALONSO AYALA LÓPEZ

Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 3501

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

Índice

	Página
Resumen	4
Introducción	6
Material y métodos	10
Resultados	12
Discusión	15
Conclusión	15
Bibliografía	16
Anexos	18

Diferencia de la concentración de coestimulador inducible (ICOS) y su ligando (ICOS-L) cuantificado por ELISA en suero de pacientes asmáticos alérgicos, asmáticos no alérgicos y pacientes sin asma

Antecedentes: En la fisiopatología del asma alérgica es necesario el reconocimiento de alérgenos que desencadenan una respuesta inflamatoria mediada por linfocitos T. Para la activación de éstas células se requiere el reconocimiento por el receptor y la presencia de moléculas coestimuladoras como el ICOS e ICOS-L que son proteínas que se expresan en la superficie de la célula pero también pueden estar en forma soluble.

Objetivo: comparar la concentración de ICOS e ICOS-L en suero de pacientes asmáticos alérgicos, no alérgicos y pacientes sin asma.

Material y métodos: estudio transversal, observacional y descriptivo. Mediante ELISA se cuantificó ICOS e ICOS-L en el suero de pacientes de 6 a 17 años que acudieron al servicio con asma alérgica, asma no alérgica y un grupo control. En los dos primeros grupos se aplicaron pruebas cutáneas con aeroalergenos.

Resultados: Se incluyeron 80 pacientes, 41 con asma alérgica, 15 con asma no alérgica y 24 sujetos sanos. La principal comorbilidad de los pacientes con asma fue rinitis crónica. La edad media de los pacientes fue de 10.25 años y el tiempo promedio de diagnóstico de asma fue de 4.2 años. Para todos los pacientes la concentración de ICOS fue de 315.53 pg/ml (0-1206 pg/ml) y para ICOS-L fue de 6.55 ng/mL (0-19.58 ng/mL). En el nivel de ICOS hubo diferencia significativa entre el grupo de sujetos sanos y el grupo con asma alérgica ($p=0.004$) y el grupo con asma no alérgica ($p=0.0004$). Para el ICOS-L hubo una diferencia significativa ($p=0.01$) entre los pacientes con asma alérgica y los sujetos sin asma. Entre los dos grupos con asma no hubo diferencia para ninguna de las dos moléculas. No hubo relación significativa entre los niveles de ICOS e ICOS-L con otras variables del estudio como sexo, edad, tiempo de diagnóstico y comorbilidades.

Conclusiones: En los pacientes con asma alérgica y no alérgica el ICOS soluble y ICOS-L se encuentran aumentados significativamente, en comparación con sujetos sin asma. Ambas moléculas pueden ser un auxiliar en el diagnóstico del asma y probablemente en la evaluación de su tratamiento.

Palabras clave: asma, alergia, ICOS, ICOS ligando.

Difference of the inducible coestimulator (ICOS) and its ligand (ICOS-L) serum levels in patients with allergic asthma, non-allergic asthma and health controls.

Background: Asthma physiopathology includes activation of T cells through recognition of allergens and the presence of ICOS and its ligand, both proteins found on cell surface but also soluble in serum.

Objective: To quantify serum levels of ICOS and ICOS-L in patients with allergic asthma, non-allergic asthma and healthy patients.

Methods: this is a cross-sectional, descriptive and observational study. Patients among 6 and 17 years old were included. We used ELISA to quantify ICOS and ICOS-L serum levels in blood samples of patients with allergic asthma, non-allergic asthma and healthy subjects. Skin prick tests were performed to define allergic asthma.

Results: Eighty subjects were enrolled, 41 with allergic asthma, 15 with non-allergic asthma and 24 without asthma. The mean age was 10.25 years. The main comorbid condition in patients with asthma was chronic rhinitis. The average for diagnosis of asthma was 4.2 years. The concentration of ICOS was 315.52 pg/mL (0-1206 pg/mL) and for ICOS-L was 6.55 ng/mL (0-19.58 ng/mL). There was a significant difference in serum levels of ICOS between healthy subjects and patients with allergic asthma ($p=0.004$) and patients with non-allergic asthma ($p=0.004$). For ICOS-L there was a significant difference ($p=0.01$) between patients with allergic asthma and subjects without asthma. Among groups with allergic and non-allergic asthma there wasn't difference for both molecules. No other clinical features were related with ICOS and ICOS-L serum levels.

Conclusion: In patients with allergic and non-allergic asthma the concentration of ICOS and ICOS-L was significantly increased when compared with healthy controls. Both molecules can be a helpful tool for diagnosis of asthma and its treatment.

Key words: asthma, allergic, ICOS, ICOS ligand.

Introducción

El asma es una de las enfermedades crónicas más prevalentes del mundo que ha ido en ascenso en los años recientes, más de 300 millones de personas alrededor del mundo la padecen.¹ Se trata de una enfermedad inflamatoria de la vía aérea caracterizada por obstrucción, hiperreactividad bronquial, aumento de eosinófilos en tejido y sangre, aumento de la secreción de moco e inflamación de la vía aérea.² Para definir si el asma tiene una etiología alérgica las guías de asma nacionales e internacionales^{3,4} consideran la presencia de otras enfermedades alérgicas (dermatitis atópica, rinitis crónica etc.), antecedentes familiares de atopia y para el diagnóstico definitivo pruebas cutáneas o cuantificación de IgE sérica específica para aeroalergenos. De esta forma las pruebas cutáneas positivas más síntomas de asma en etapa escolar y en adolescentes nos indican con bastante precisión que se trata de asma alérgica, mientras que un resultado negativo nos indicaría asma no alérgica.

La exposición a aeroalergenos en pacientes sensibilizados inicia una respuesta T cooperadora 2 (Th2), que resulta en la producción de interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 13 (IL-13) por células T CD4+. Esta polarización Th2 es principalmente controlada por células presentadoras de antígenos que provee las señales para la diferenciación de células T naive en células Th2.⁵ Esta estimulación se da mediante el reconocimiento del complejo mayor de histocompatibilidad por el receptor de célula T más una segunda señal a cargo de moléculas coestimuladoras que regulan la activación o inhibición de células T mediante la unión a sus ligandos.⁶

Una de estas moléculas es el coestimulador inducible (ICOS) que se encuentra en la familia de coestimuladores B7 y es homólogo en estructura y función al CD28. Ambos son receptores tipo I expresados como homodímeros con un dominio tipo inmunoglobulina, es preferentemente expresada por células Th2 y T reguladoras Tregs.⁷ Existen estudios que comprueban que al transferir células T enriquecidas con ICOS seguidas de un estímulo con alérgenos se produce infiltración de células T y B y la producción local de IgE alérgico específica.⁸

En estudios en ratas se descubrió que ICOS se expresa en las células NKT invariables (iNKT) CD4+ y que provee señales de supervivencia en la periferia y homeostasis. Los

animales con niveles altos de expresión se sensibilizaron y desafiaron con ovoalbúmina, lo que produjo aumento de citocinas e hiperreactividad bronquial.⁹

También en modelos animales se encontró que la interacción de CD40-CD154 es esencial para la activación de células B y la formación de centros germinales (CG). La IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 son importantes para la proliferación de células B y el cambio de isotipo. Los ratones que no expresan ICOS presentan activación deficiente de las células B, son incapaces de formar CG en una respuesta secundaria a un antígeno y por lo tanto presentan alteración en la producción de anticuerpos.¹⁰

En estudios con humanos se ha demostrado que la expresión de ICOS en la membrana de células Tregs se incrementa al ser sensibilizado y expuesto a alérgenos.¹¹ ICOS estimula ambos perfiles de citocinas Th1 y Th2, sin embargo parece tener preferencia por el desarrollo de células Th2. La vía de ICOS-B7RP-1 se encuentra involucrada en el desarrollo de inflamación de la vías a aéreas.^{12, 13}

Se ha sugerido también que la función de ICOS y la unión con su ligando puede favorecer la migración de linfocitos T y B y la producción de IgE en tejido pulmonar mediante la expresión de quimiocinas CCL2 y CCL13.¹⁴ ICOS también regularía a la baja CCR7 y CD62L (L-selectina) receptores que serían los responsables de que las células T migraran a ganglios linfáticos en lugar de permanecer en tejido periféricos como sería el tejido pulmonar.¹⁵

Los niveles de moléculas coestimuladoras en su forma soluble han sido descritos en enfermedades alérgicas y autoinmunes, por ejemplo Shi y colaboradores mostraron concentraciones mayores de CD86 soluble (CD86s) en asmáticos descontrolados que en asmáticos controlados y controles sanos. No hubo diferencia entre los pacientes controlados y los controles. Describieron también una relación directa entre los niveles de CD86s en suero y la gravedad del asma. Además encontraron que CD86s podía ser regulada a la baja con la administración de glucocorticoides orales e inhalados en pacientes asmáticos, lo que podría explicar la respuesta al tratamiento con este grupo de medicamentos.^{16, 17}

Se ha observado CD86s significativamente alto en el lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos después de reto con solución salina y alérgenos en comparación a los controles.¹⁸

La interacción de ICOS con su ligando contribuye al desarrollo de la inflamación mediada por células Th17 mediante la producción de IL-17, que produce hiperreactividad de la vía aérea en modelos animales. Paradójicamente la supresión de esta inflamación después de exposiciones repetidas a reto con alérgeno es mediada también por la interacción de ICOS/ICOSL mediante la expansión y supervivencia células Treg Foxp3+ICOS+.¹⁹

El ICOS soluble se ha encontrado significativamente elevado en pacientes con lupus eritematoso sistémico en relación a los controles. Y también se encontró más alto en pacientes con actividad *versus* pacientes con Lupus inactivo.²⁰ En la esclerosis sistémica progresiva hay dos estudios que demuestran una correlación directa de la concentración elevada de ICOS soluble y la gravedad de la esclerosis cutánea, la presencia de enfermedad pulmonar intersticial con la caída de la capacidad vital en las pruebas funcionales.^{21, 22}

Es posible de que el ICOS se exprese en la superficie de las células secundario a inflamación bronquial, como ocurre en la respuesta de tolerancia inducida en linfocitos T reguladores por células B de placas de Peyer.²²

Actualmente se considera al ICOS como un marcador de superficie de células reguladoras.²³ También se sabe que el uso de corticoesteroides como la budesonida incrementa el número de células que expresan ICOS en su superficie.²⁴

El uso de anticuerpos monoclonales usados para bloquear la unión de ICOS con su ligando es capaz de disminuir la secreción de IL-10, al inhibir la activación de células Treg.²⁵

El asma es la enfermedad crónica más frecuente en la etapa escolar y adolescente cuya prevalencia en el mundo va en ascenso, por lo que los estudios que aportan conocimiento acerca de esta enfermedad son de gran importancia. No existen estudios previos que describan si hay diferencia entre la concentración de ICOS y ICOS ligando

soluble en el plasma de pacientes con asma alérgica, asma no alérgica y sujetos sanos. Éstos podrían estar elevados en relación al proceso inflamatorio característico del asma.

La prevalencia del asma va en aumento, en el centro del país es de aproximadamente 9.1% en el grupo de edad de los 6 a los 17 años. En nuestro servicio el asma es el segundo motivo de consulta sólo después de la rinitis alérgica.

El objetivo de nuestro estudio fue saber si hay diferencia en la concentración sérica de ICOS y su ligando soluble cuantificado por ELISA en los tres grupos de pacientes.

Material y métodos

Se trata de un estudio transversal, observacional y descriptivo realizado en pacientes de 6 a 17 años de edad, de ambos sexos, con diagnóstico de asma de acuerdo a los lineamientos de GINA 2012, establecido en el Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Centro Médico Nacional La Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social. En los criterios de selección se consideró que tuvieran al menos cuatro semanas sin esteroides sistémicos, que no tuvieran antecedente de otras enfermedades inflamatorias o de involucro inmunológico (inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes, etc.). Se incluyó un grupo de sujetos sin enfermedades inmunoalérgicas que acudían a otros servicios del hospital. Los pacientes se reclutaron de diciembre 2013 a marzo 2014. Todos los participantes que accedieron a participar en el estudio firmaron consentimiento bajo información. El protocolo fue presentado y aprobado por el Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud del Hospital de Especialidades del Centro Médico La Raza, con el número de registro R-2014-3501-32.

A todos los participantes o a sus tutores se les hizo un breve cuestionario acerca de datos sociodemográficos y referentes al diagnóstico de asma. Se les invitó a participar en el estudio explicándoles los detalles y solicitando su consentimiento. Se hicieron pruebas cutáneas por punción con el panel estándar de aeroalergenos que incluyó: pólenes (*Alamo sp*, *Amaranthus p*, *Ambrosia e*, *Ambrosia t*, *Artemisa v*, *Capriola d*, *Cosmos b*, *Chenopodium a*, *Fraxinus a*, *Helianthus a*, *Holcus h*, *Ligustrum*, *Quercus sp*, *Schinus sp*), hongos (*Alternaria sp*, *Aspergillus sp*, *Rhizopus sp*, *Mucor sp*, *Penicillium sp*), alérgenos intradomiciliarios (*Dermatoph sp*, cucaracha, gato, perro, plumas, polvo casero) se usaron extractos alérgicos dilución 1:20, peso/volumen, con glicerina al 50% (Alerquim México). Se usó como control positivo fosfato de histamina (1 mg/ml) y control negativo de solución de Evans (con glicerina al 50%). Después de presionar con lanceta duotip sobre cada alérgeno, a los 15 minutos se hizo la lectura de los resultados, y se consideró un resultado positivo cuando el tamaño de la roncha de los extractos alérgicos fue mayor en 3 mm al control negativo.

Se calculó un tamaño de muestra suficiente de 26 pacientes en base a la proporción de pacientes con asma que acuden a consulta al departamento de Alergia e Inmunología Clínica.

Se tomaron muestras sanguíneas por punción endovenosa con técnica aséptica en tubos estériles libres de pirógenos. Se dejó en reposo la muestra por una hora en refrigeración, posteriormente se centrifugó, una vez separados los sueros se congelaron a menos 70 grados centígrados. La medición de ICOS e ICOS-L soluble en suero se hizo mediante la técnica de ELISA (Uscn life science Inc. Wuhan, China). Se consideró como límites de detección para ICOS 7 pg/ml y para ICOS-L 0.165 ng/mL.

Se realizó un análisis univariado con frecuencias simples, porcentajes y medidas de tendencia central y de dispersión de las variables del estudio, además de un análisis comparativo de variables mediante pruebas paramétricas y no paramétricas, considerando un valor significativo una $p < 0.05$. Se hizo una base de datos con los datos recolectados en el cuestionario, se analizó la información mediante los paquetes estadístico SPSS versión 17.

Resultados

Se incluyeron 80 pacientes: 41 con asma alérgica, 15 con asma no alérgica y 24 sujetos sanos. El porcentaje de pacientes masculinos fue de 49.3% y femeninos de 50.7% en los tres grupos. La principal comorbilidad de los pacientes con asma fue rinitis crónica. El alérgeno positivo más frecuente fue el ácaro (*Dermatophagoides sp*), seguido de pólenes, *Capriola sp* y *Fraxinus sp* en orden de frecuencia. La edad más frecuente al diagnóstico fue entre los 8 y los 11 años de edad. La edad media de todos los pacientes fue de 10.25 años y el tiempo promedio de diagnóstico de asma fue de 4.2 años. Para todos los pacientes incluidos la media de la concentración de ICOS fue de 315.52 pg/mL (rango de 0 a 1206 pg/mL) y para ICOS-L 6.55 ng/mL (rango 0-19.58 ng/mL). En el grupo de los pacientes asmáticos alérgicos la concentración media de ICOS fue de 350.78pg/mL, pacientes asmáticos no alérgicos 454.20 pg/mL y pacientes sin asma 113.33 pg/mL, con diferencia significativa entre el grupo de sujetos sanos y el grupo de pacientes con asma alérgica ($p=0.004$) y asma no alérgica ($p=0.0004$). Entre éstos dos grupos no hubo diferencia significativa. (figura 1). En el caso del ICOS-L la media del grupo de pacientes asmáticos alérgicos, fue de 7.10 ng/mL, en los asmáticos no alérgicos de 7.42 ng/mL y en los sujetos sin asma fue de 4.96 ng/mL. La diferencia entre los pacientes con asma alérgica y los sujetos sin asma fue significativa ($p=0.01$), así como entre los no asmáticos y los pacientes con asma (figura 2). No hubo relación significativa entre los niveles de ICOS e ICOS-L con: sexo, edad, tiempo de diagnóstico y comorbilidades asociadas al asma.

Figura 1. Concentración de ICOS en asmáticos alérgicos, asmáticos no alérgicos y sujetos sanos.

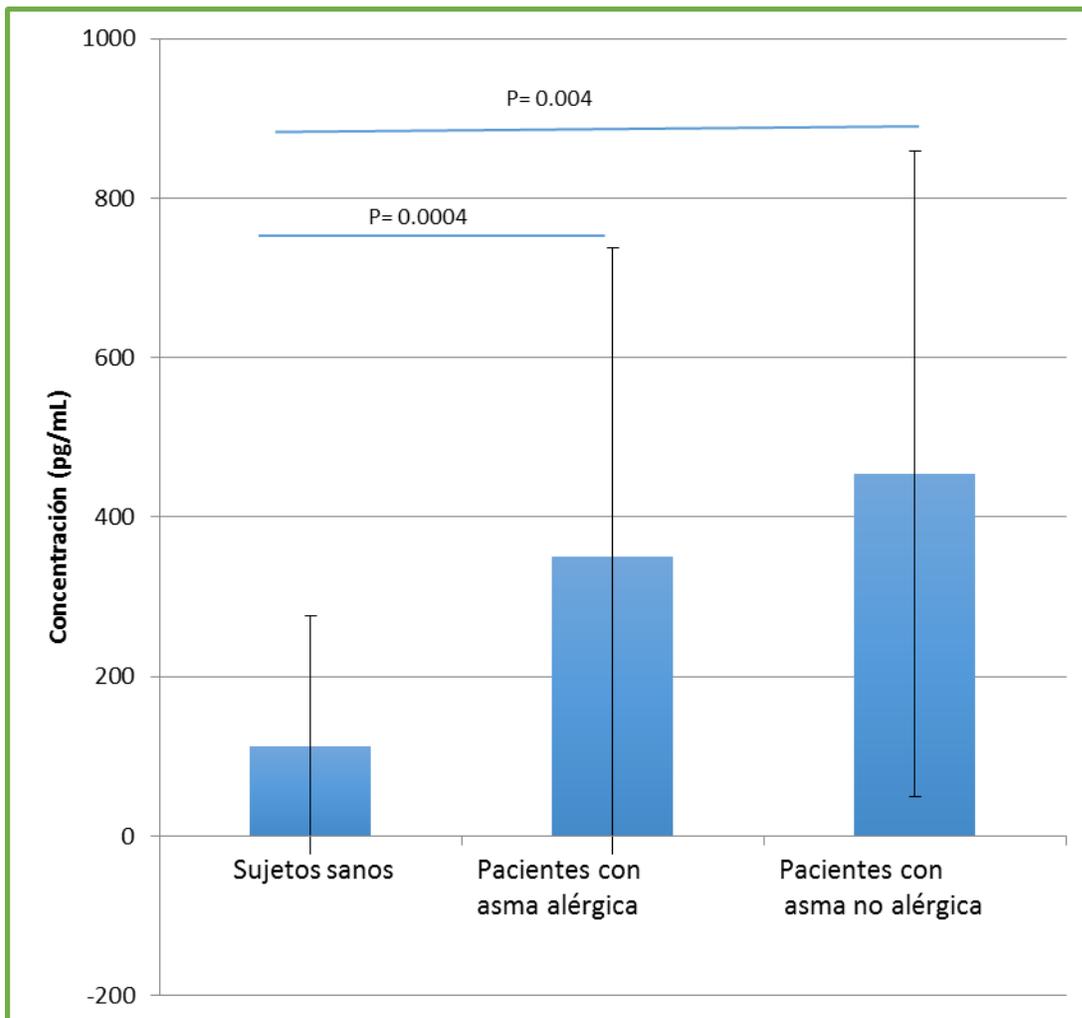
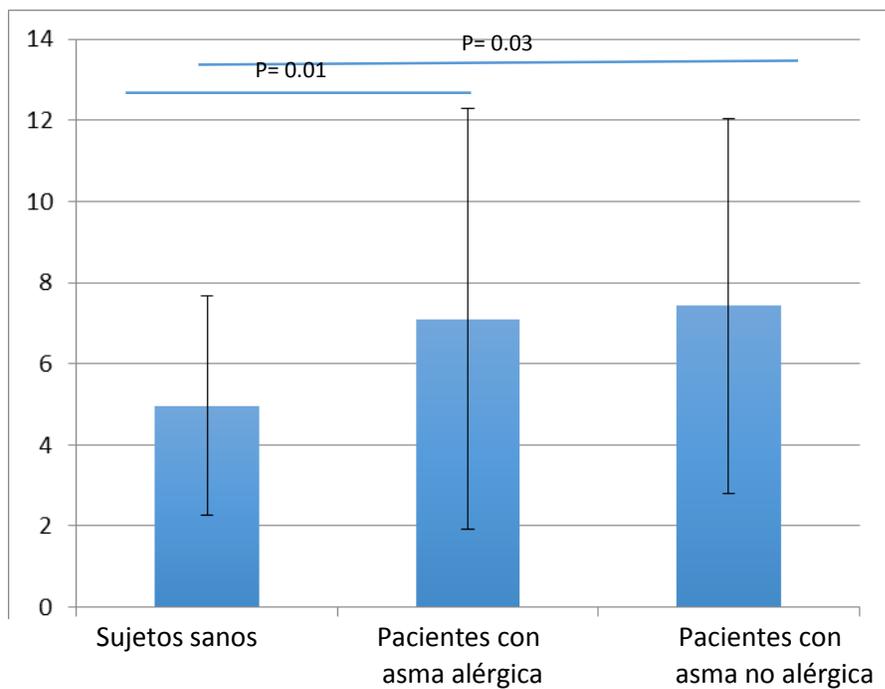


Figura 2. Concentración de ICOS-L en asmáticos alérgicos, asmáticos no alérgicos y sujetos sanos.



Discusión

El ICOS y su ligando son proteínas que juegan un rol importante en la inmunidad mediante su participación en la activación, limitación y modulación de la respuesta de las células T. Un importante número de estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la expresión de ICOS e ICOS-L favorecen la respuesta Th2 y regulan la inmunidad humoral. Sin embargo la falta de regulación de esta vía se ha demostrado que resulta en enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y miositis, así como, enfermedades de respuesta Th2 como el asma alérgica.²⁶ Algunos autores han encontrado que en modelos animales genéticamente modificados que no producen ICOS y su ligando no es posible provocar sensibilización con ovoalbúmina, hay una menor hiperreactividad bronquial, un número menor de eosinófilos y una producción aumentada de moco a diferencia de los animales que sí lo producían.²⁷ Este estudio sugiere que la interacción de ICOS e ICOS-L es primordial para la activación de las células T especialmente de las Th2, y por lo tanto, la alteración de la función pulmonar.

Se ha demostrado que el incremento del ICOS-L en su forma soluble esta en relación con la mayor producción por parte de las células B durante su activación por lo que podría ser un indicador directo de la producción de anticuerpos, citocinas e inflamación.²⁸ La expresión de ICOS en células T parece incrementar también la producción de autoanticuerpos e IL-10.²⁹

Como se ha mencionado, estudios previos han demostrado que ICOS y su ligando son importantes para la respuesta inmune Th2 y la producción de citocinas en modelos animales pero también en humanos ^{30,31}. Tafuri y colaboradores ³² han encontrado que la expresión en la superficie celular de ICOS incrementa la producción de anticuerpos, pero disminuye el número de eosinófilos en pulmón, también disminuye los linfocitos Th2 y la producción de citocinas, por lo que se convirtió en el primer estudio en demostrar que la expresión de ICOS podría tener un papel regulador en las enfermedades alérgicas inflamatorias y contradecir los hallazgos previos donde la actividad del perfil Th2 era favorecido, esto se podría deber a que todavía no se conoce con exactitud los factores que favorecen la regulación a la alta y a la baja de ICOS y ICOS-L.

Se sabe también que la pérdida homocigota por delección de esta molécula evita que haya formación de centros germinales, cambio de cadena pesada y por lo tanto falta de producción de anticuerpos específicos como sucede en pacientes con inmunodeficiencias de anticuerpos en los que se ha demostrado la falta de expresión de ICOS y su ligando.³³

En un estudio que demostró que la sensibilización alérgica en la vía aérea también indujo respuestas reguladoras que aumentan en relación a la exposición al alérgeno, por lo que los sujetos que son expuestos en múltiples ocasiones a alérgenos desarrollan una mejor respuesta reguladora y por lo tanto protectora contra el asma.¹⁹ La enfermedad clínica como en el caso del asma alérgica podría representar una falla en esta respuesta reguladora o moduladora.

Compatible con lo anterior, algunos otros autores demostraron que la molécula coestimuladora ICOS se expresa en la membrana de linfocitos T reguladores y que por lo tanto el efecto de la expresión de esta molécula era favorecer la modulación de la respuesta inflamatoria. El papel biológico de estas moléculas en las enfermedades inflamatorias no está del todo establecido. En nuestro estudio encontramos un aumento significativo de las formas solubles del ICOS e ICOS-L en los pacientes con asma alérgica y no alérgica, en comparación con los sujetos sanos en los cuales la concentración de ambas moléculas era significativamente menor, no hay reportes previos de la determinación de estas moléculas en sujetos con asma. En otras enfermedades inflamatorias (Lupus eritematoso sistémico y esclerosis sistémica) ambas moléculas se han encontrado elevadas.^{20,21}

Creemos que ambas moléculas pueden ser de utilidad como marcadores diagnósticos del asma, si se confirman nuestros hallazgos en muestras más grandes de pacientes con asma y mayor número de controles de población sana. Otro aspecto de posible utilidad clínica es sobre la evaluación de éstos marcadores en el tratamiento del asma. Además resultaría interesante en futuros estudios investigar la relación entre la cantidad de ICOS y su ligando, con la gravedad y el control del asma y su fenotipo, esto con el fin de que la determinación de estas moléculas también nos pudieran ser de utilidad como marcadores pronósticos.

Conclusión

En los pacientes con asma alérgica y no alérgica el ICOS e ICOS-L se encuentran aumentados significativamente en comparación con personas sin asma. El valor de la cuantificación de ICOS y su ligando, su relación con la gravedad, el control y el pronóstico del paciente asmático deberá ser estudiado en trabajos posteriores.

Bibliografía

1. Bousquet J, Khaltaev N. Global Surveillance, Prevention and Control of Chronic Respiratory Diseases. Geneva, World Health Organization, 2007, pp 15-20.
2. Ohtomo T, Myake S, Kajiyama Y et. al. Airway eosinophilic inflammation is attenuated in conserved noncoding sequence-1-deficient mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;146:2-6.
3. British Thoracic Society. British Guideline on the Management of Asthma. Londres 2008.
4. Secretaría de Salud. Diagnóstico y tratamiento del asma en menores de 18 años en el primero y segundo niveles de Salud; México Distrito Federal 2008.
5. Lombardi V, Singh AK Akbari O. The role of coestimulatory molecules in allergic disease and asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;151:179-189.
6. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 515–548.
7. Hutloff, A., A. M. Dittrich, K. C. Beier, B. et al. ICOS is an inducible T-cell costimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*1999;397: 263–266.
8. Beier KC, Hutloff A, Lohning M, et al. Inducible costimulator- positive T cells are required for allergen-induced local B-cell infiltration and antigen-specific IgE production in lung tissue. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:775–782.
9. Akbari O, Stock P, Meyer EH, et al. ICOS/ICOSL Interaction Is Required for CD4+ Invariant NKT Cell Function and Homeostatic Survival. *J Immunol*, 2008; 180: 5448–5456.
10. Dong C, Temann UA, Flavell RA. Cutting Edge: Critical Role of inducible Coestimulator in Germinal Center Reactions. *J Immunol* 2001; 166:3659-3662.
11. McGee HS, Edwan JH, Agrawal K. Flt3-L Increases CD4+CD25+Foxp3+ICOS+ Cells in the Lungs of Cockroach-Sensitized and Challenged Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010; 42:331-340

- 12.Chen YQ, Shi HZ. CD28/CTLA-4-CD80/CD86 and ICOS-B7RP-1 costimulatory pathway in bronchial asthma. *Allergy* 2006; 61: 15-26.
- 13.Clay BS, Shilling RA, Bandukwala HS, Moore TV, Cannon JL, Welcher AA, et al. Inducible costimulator expression regulates the magnitude of Th2-mediated airway inflammation by regulating the number of Th2 cells. *PLoS One* 2009; 4: e7525.
- 14.Tesciuba AG, Shilling RA, Agarwal MD et al. ICOS costimulation expands Th2 immunity by augmenting migration of lymphocytes to draining lymph nodes. *J Immunol* 2008; 181:1019–1024.
- 15.Moore TV, Clay BS, Cannon JL. Inducible Costimulator Controls Migration of T Cells to the Lungs via Down-Regulation of CCR7 and CD62L. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 45:843–850.
- 16.Shi HZ, Xie ZF, Deng JM, Chen YQ, Xiao CQ: Soluble CD86 protein in serum samples of patients with asthma. *Thorax* 2004; 59: 870–875.
- 17.Deng JM, Shi HZ, Qin XJ, Xie ZF, Huang CP, Zhong XN: Effects of allergen inhalation and oral glucocorticoid on concentrations of serum-soluble CD86 in allergic asthmatics. *Clin Immunol* 2005; 115: 178–183.
- 18.Liang XD, Shi HZ, Qin XJ et al. Increase in Concentration of Soluble CD86 After Segmental Allergen Challenge in Patients With Allergic Asthma. *CHEST* 2006; 130:1048 –1054.
- 19.Whitehead GS, Wilson RH, Nakano K, et al. IL-35 production by inducible costimulator (ICOS)-positive regulatory T cells reverses established IL-17-dependent allergic airways disease. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:207-15.
- 20.Her M, Kim D, Oh M et al. Increased expression of soluble inducible costimulator ligand (ICOSL) in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2009;18: 501–507.
- 21.Yanaba K, Asano Y, Noda S et. al. Increased production of soluble inducible costimulator in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. [abstract]. *Arch Dermatol Res.* 2013;305:17-23.
- 22.Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Takehara K. Augmented Expression of Inducible Costimulator (ICOS) and Its Ligand (ICOSL) in Patients with Systemic Sclerosis. [abstract]. *Arthritis Rheum* 2011;63 Suppl 10 :1488

23. Chu KH, Chiang BL. Regulatory T cells induced by mucosal B cells alleviate allergic airway hypersensitivity. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;46:651-9.
24. Huang H, Dawicki W, Lu M, et al. Regulatory dendritic cell expression of MHCII and IL-10 are jointly requisite for induction of tolerance in a murine model of OVA-asthma. *Allergy.* 2013;68:1126-35.
25. Pace E, Di Sano C, La Grutta S et al. Multiple In Vitro and In Vivo Regulatory Effects of Budesonide in CD4+ T Lymphocyte Subpopulations of Allergic Asthmatics. *Plos One* 2012;7:e48816.
26. Hutloff A, Buchner K, Reiter K, et al. Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3211–3220.
27. Kadkhoda K, Wang S, Fan Y, Qiu Y, Basu S, Halayko AJ and Yang X. ICOS ligand expression is essential for allergic airway hyperresponsiveness. *International Immunology* 2011; 23: 239–249
28. Dong C, Juedes AE, Temann U, Shresta S, Allison JP, et al. ICOS costimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 2001; 409: 97–101.
29. McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, et al. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 2001; 409: 102.
30. Iwai H, Abe M, Hirose S, et al. Involvement of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulatory pathway in murine lupus nephritis. *J Immunol* 2003; 171: 2848–2854.
31. Logue EC, Bakkour S, Murphy MM, Nolla H, Sha WC. ICOS induced B7h shedding on B cells is inhibited by TLR7/8 and TLR9. *J Immunol* 2006; 177: 2356–2364.
32. Tafuri A, Shahinian A, Bladt F, Yoshinaga SK, Jordana M, et al. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 2001; 409: 105.
33. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nature immunology* 2003; 3: 261-268.

Anexos - Carta de Consentimiento Bajo Información

Instituto Mexicano del Seguro Social Unidad Médica de Alta Especialidad La Raza

Diferencia entre la concentración de coestimulador inducible (ICOS) y su ligando (ICOS L) cuantificado por ELISA en suero de pacientes asmáticos alérgicos, asmáticos no alérgicos y pacientes sin asma

Carta de Consentimiento Bajo Información para la Participación en Protocolos de Investigación Clínica

NOM-004-SSA3-2012, del expediente clínico

Lugar y fecha: Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional la Raza, servicio de Alergia e Inmunología clínica, de Diciembre del 2013 a Marzo del 2014.

Número de Registro: en trámite

Justificación y objetivo del Estudio: El Objetivo del estudio es identificar en sangre la cantidad del ligando molécula coestimuladora inducible (ICOS) en pacientes asmáticos alérgicos y no alérgicos que podría ayudar a diagnosticar o a tratar esta enfermedad.

Procedimiento: Me han explicado que mi participación consistirá en permitir la obtención de la información a través de un cuestionario el cual contendrá preguntas de fácil entendimiento y no provocara algún daño.

Riesgos y molestias del Estudio: Los riesgos del estudio son mínimos ya que solo se tratara de la aplicación de un cuestionario y la toma de una muestra de laboratorio para determinación de niveles séricos ICOS e ICOSL soluble, el riesgo del procedimiento podría ser hematoma (moretón) y dolor en el sitio de punción, menos frecuentemente que llegara a presentarse infección en el sitio a pesar de la técnica aséptica (limpieza con alcohol) y el uso de material estéril y desechable.

Beneficios del Estudio: La participación en este estudio permitirá un diagnóstico más completo y preciso así como la intervención oportuna en los factores que se encuentren como problemas y así evitar la aparición de complicaciones.

Información sobre resultados y alternativas de tratamiento: se me informa que se me contactará vía telefónica para informarle acerca del resultado del estudio y si hay necesidad de realizar algún cambio en el tratamiento o alguna otra intervención diagnóstica.

Participación o retiro: Si decido no participar no se me negará el acceso a ningún servicio de salud y podré retirarme al momento que lo desee.

Costos: La participación de este estudio no tiene ningún costo para mí.

Privacidad y confidencialidad: La información y resultados de este estudio son confidenciales y solo me serán proporcionados a mí. En caso de que tuviera alguna duda relacionada con la participación de mi paciente, podré contactarme con la investigadora responsable.

Colección de material biológico:

No autorizo que se tome la muestra. _____

Sí autorizo que se tome la muestra solo para este estudio. _____

Sí autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros. _____

Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes: en caso de ameritar tratamiento para mi enfermedad me será proporcionado siendo derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigador Responsable: Marisol Rico Arroyo celular: 5529948840 correo electrónico: marisolrico@gmail.com

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse

a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx

Fecha, Nombre y firma del padre o Tutor

Testigo 1

Testigo 2

Fecha, Nombre y firma

Dra. Marisol Rico Arroyo

Nombre y Firma del Investigador

Carta de consentimiento para pacientes sin asma

Instituto Mexicano del Seguro Social Unidad Médica de Alta Especialidad La Raza

Diferencia entre la concentración de coestimulador inducible (ICOS) y su ligando (ICOS L) cuantificado por ELISA en suero de pacientes asmáticos alérgicos, asmáticos no alérgicos y pacientes sin asma

Carta de Consentimiento Bajo Información para la Participación en Protocolos de Investigación Clínica

NOM-004-SSA3-2012, del expediente clínico

Lugar y fecha: Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional la Raza, servicio de Alergia e Inmunología clínica, de Diciembre del 2013 a Marzo del 2014.

Número de Registro: en trámite

Justificación y objetivo del Estudio: El Objetivo del estudio es identificar en sangre la cantidad del ligando molécula coestimuladora inducible (ICOS) en pacientes asmáticos alérgicos y no alérgicos que podría ayudar a diagnosticar o a tratar esta enfermedad.

Procedimiento: Me han explicado que mi participación consistirá en permitir la obtención de la información a través de un cuestionario el cual contendrá preguntas de fácil entendimiento y no provocara algún daño.

Riesgos y molestias del Estudio: Los riesgos del estudio son mínimos ya que solo se tratara de la aplicación de un cuestionario y la toma de una muestra de laboratorio para determinación de niveles séricos ICOS e ICOSL soluble, la cual requerirá la toma de un tubo de sangre extra con la misma venopunción (piquete) para la toma de mis laboratorios solicitados por mi médico de manera inicial, el riesgo del procedimiento podría ser hematoma (moretón) y dolor en el sitio de punción, menos frecuentemente que llegara a presentarse infección en el sitio a pesar de la técnica aséptica (limpieza con alcohol) y el uso de material estéril y desechable.

Beneficios del Estudio: La participación en este estudio permitirá un diagnóstico más completo y preciso así como la intervención oportuna de los niños y adolescentes que padezcan asma.

Información sobre resultados y alternativas de tratamiento: se me informa que se me contactará vía telefónica para informarle acerca del resultado del estudio y si hay necesidad de realizar algún cambio en el tratamiento o alguna otra intervención diagnóstica.

Participación o retiro: Si decido no participar no se me negará el acceso a ningún servicio de salud y podré retirarme al momento que lo desee.

Costos: La participación de este estudio no tiene ningún costo para mí.

Privacidad y confidencialidad: La información y resultados de este estudio son confidenciales y solo me serán proporcionados a mí. En caso de que tuviera alguna duda relacionada con la participación de mi paciente, podré contactarme con la investigadora responsable.

Colección de material biológico:

No autorizo que se tome la muestra.

Sí autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.

Sí autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros.

Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes: en caso de ameritar tratamiento para mi enfermedad me será proporcionado siendo derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:
Investigador Responsable: Marisol Rico Arroyo celular: 5529948840 correo electrónico: marisolricoa@gmail.com

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx

Fecha, Nombre y firma del padre o Tutor

Testigo 1

Testigo 2

Fecha, Nombre y firma

Dra. Marisol Rico Arroyo

Nombre y Firma del Investigador

Cronograma de actividades

Actividad	2013	2014		
	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo
Elección del tema y búsqueda de bibliografía	XX			
Elaboración del protocolo	XX			
Envío a revisión por el asesor	XX			
Comité local de Investigación y aprobación del Proyecto		XX		
Levantamiento de encuestas y recolección de datos		XX		
Análisis y procesamiento de la información	XX	XX	XX	XX
Resultados Finales y presentación de tesis				XX

Anexo 2. Instrumentos de recolección de datos para pacientes con asma y sujetos sin asma



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DR. ANTONIO FRAGA MOURET

Diferencia entre la concentración de coestimulador inducible (ICOS) y su ligando (ICOS L) cuantificado por ELISA en suero de pacientes asmáticos alérgicos, asmáticos no alérgicos y pacientes sin asma

Folio No.

Fecha

I. DATOS DE IDENTIFICACIÓN

1.1 Nombre

Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre (s)
------------------	------------------	------------

1.2 Domicilio:

Calle y Número	Colonia	Municipio
----------------	---------	-----------

1.3. No. de afiliación: Estado Teléfono

1.4 Unidad Médica de adscripción **1.5 HGZ de referencia**

1.6 Ciudad de Origen **1.7 Edad** años **1.8 Genero** M F

II. DIAGNÓSTICO DE ASMA

2.1 Fecha de diagnóstico

2.2 Pruebas de función pulmonar Sí No

2.3 Describir

2.4 Pruebas cutáneas Sí No

2.5 Resultado de pruebas cutáneas Positivas Negativas

2.6 Anotar sólo resultados positivos

Histamina

Alergenos

2.7 Resultado de ELISA: ICOS ICOS L

2.8 IgE sérica



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DR. ANTONIO FRAGA MOURET

Diferencia entre la concentración de coestimulador inducible (ICOS) y su ligando (ICOS L) cuantificado por ELISA en suero de pacientes asmáticos alérgicos, asmáticos no alérgicos y pacientes sin asma

Fecha

I. DATOS DE IDENTIFICACIÓN

1.1 Nombre

Apellido Paterno

Apellido Materno

Nombre (s)

1.2 Domicilio:

Calle y Número

Colonia

Municipio

1.3. No. de afiliación:

Estado

Teléfono

1.4 Unidad Médica de adscripción

1.5 HGZ de referencia

1.6 Ciudad de Origen

1.7 Edad años

1.8 Genero M F

II. SUJETOS SIN ASMA

¿Alguna vez le han diagnosticado a su paciente asma o le han prescrito algún tratamiento para asma?

Sí

No

En caso afirmativo, ¿cual? _____

En caso negativo, conteste SI o NO a las siguientes preguntas:

¿Ha tenido el paciente un ataque o ataques recurrentes de sibilancias?

Sí

No

¿Ha tenido el paciente problemas de tos en la noche?

Sí

No

¿Ha tenido el paciente sibilancias o tos después de hacer ejercicio?

Sí

No

¿Ha tenido el paciente sibilancias, tirantez del pecho, o tos después de la exposición a los alergenicos o a los agentes contaminantes aerotransportados?

Sí

No

¿Los resfríos de los pacientes se "van al pecho" o toman más de 10 días en aliviarse?

Sí

No

¿Mejoran los síntomas con el tratamiento anti-asmático apropiado?

Sí

No