



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.
CAMPO DEL CONOCIMIENTO CIENCIAS MÉDICAS.

**EXPRESIÓN GÉNICA Y PERFIL DE METILACIÓN EN LOS PROMOTORES DE LOS
GENES DE *TNFA*, *IL17A* Y *RORC* EN LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA EN
ADOLESCENTES CON ASMA ASOCIADA A LA OBESIDAD.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA

DR. JOSÉ DE JESÚS LEIJA MARTÍNEZ.

TUTOR

DRA. FENGYANG HUANG
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN FARMACOLOGÍA.
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. BLANCA ESTELA DEL RÍO NAVARRO.
DEPARTAMENTO DE ALERGIA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA PEDIÁTRICA.
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.

DR. FAUSTO SÁNCHEZ MUÑOZ.
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHAVEZ"

RESPONSABLE DE LA ENTIDAD ACADEMICA

DR. ONOFRE MUÑOZ HERNÁNDEZ.
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, JULIO 2021



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.

EXPRESIÓN GÉNICA Y PERFIL DE METILACIÓN EN LOS PROMOTORES DE LOS GENES DE *TNFA*, *IL17A* Y *RORC* EN LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA EN ADOLESCENTES CON ASMA ASOCIADA A LA OBESIDAD.

REGISTRO: HIM/2013/015, SSa. 1061.

ALUMNO DE DOCTORADO

DR. JOSÉ DE JESÚS LEIJA MARTÍNEZ.

TUTOR

DRA. FENGYANG HUANG.

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN FARMACOLOGÍA.

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.

INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS D.

COMITÉ TUTORIAL

DRA. BLANCA ESTELA DEL RIO NAVARRO.

JEFE DE SERVICIO DE ALERGÍA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA PEDIÁTRICA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.

DR. FAUSTO SÁNCHEZ MUÑOZ.

DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA
IGNACIO CHÁVEZ

INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS D.

ASESOR EN BIOLOGÍA MOLECULAR.

DR. ABRAHAM GIACOMAN MARTÍNEZ.

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN FARMACOLOGÍA.

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.

RESPONSABLE DE LA ENTIDAD

DR. ONOFRE MUÑOZ HERNÁNDEZ.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres José de Jesús Leija Aguilar y María Guadalupe Martínez de Leija por darme todo su amor y su producto es mi felicidad.

A la Dra. Fengyang Huang por su apoyo incondicional para terminar y empezar nuevos proyectos de investigación en esta línea del asma asociada a la obesidad.

A la Dra. Blanca Estela Del Río Navarro por su apoyo para iniciar una nueva vida académica.

Al Dr. Fausto Sánchez Muñoz por sus excelentes consejos académicos los cuales fueron fundamentales para iniciarme en las publicaciones científicas de revistas prestigiadas.

Al Dr. Abraham Giacomán Martínez por compartirme sus conocimientos y técnicas en biología molecular, las cuales fueron esenciales en el presente proyecto de investigación.

Al Dr. Onofre Muñoz Hernández por su apoyo y confianza para iniciarme en la investigación clínica, por sus importantes aportaciones científicas al presente proyecto, pero sobre todo por sus valiosos consejos.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS:	3
ÍNDICE	4
RESUMEN.....	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN.....	8
MARCO TEÓRICO	11
El papel del tejido adiposo disfuncional en el asma no-alérgica asociada a la obesidad.	11
Mecanismos moleculares para la diferenciación y activación del linfocito Th17.	14
TNF- α en el asma no-alérgica asociado a la obesidad.....	17
IL-17A en el asma no-alérgica asociada a la obesidad.	18
La biología del TNF- α y la IL-17A en el asma.	20
La metilación del ADN y la regulación de la expresión génica.	23
El papel de la metilación del ADN en la diferenciación de los linfocitos Th17.....	24
Metilación del ADN en el asma alérgica.	27
Metilación del ADN en el asma no-alérgica asociada a la obesidad.	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	34
HIPÓTESIS	34
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
JUSTIFICACIÓN	35
METODOLOGÍA.....	36
Diseño del estudio.	36
Universo de estudio.....	36
CRITERIOS DE SELECCIÓN	36
Criterios de inclusión.	36
Criterios de exclusión.	38
Criterios de eliminación.	39
DEFINICIONES OPERACIONALES DE LAS VARIABLES.....	40
Variables dependientes.....	40
Variables independientes.	42
Variables de confusión.	44
TAMAÑO DE LA MUESTRA	48
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
CONSIDERACIONES ÉTICAS	50

CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD	51
DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO	52
RECURSOS HUMANOS E INFRAESTRUCTURA FÍSICA	54
ENSAYO DE LABORATORIO	55
Determinación de las concentraciones séricas de TNF- α e IL-17A.....	55
Determinación de la expresión génica.	55
Determinación del porcentaje de metilación del ADN.....	57
RESULTADOS	60
Características clínicas en los cuatro grupos de adolescentes.	60
Concentraciones séricas de TNF- α y expresión génica de <i>TNFA</i>	62
Perfil de metilación en el promotor de <i>TNFA</i>	64
Concentraciones séricas de IL-17A y expresión génica de <i>IL17A</i>	65
Perfil de metilación en el promotor de <i>IL17A</i>	68
Expresión génica de <i>RORC</i>	69
Perfil de metilación en el promotor de <i>RORC</i>	70
Correlación entre la expresión génica de <i>TNFA</i> , <i>IL17A</i> y <i>RORC</i> y las concentraciones séricas de TNF- α e IL-17A.....	78
Correlaciones entre el perfil de metilación en los promotores de los genes de <i>TNFA</i> , <i>IL17A</i> y <i>RORC</i> , y la expresión génica de <i>TNFA</i> , <i>IL17A</i> y <i>RORC</i>	80
DISCUSIÓN.....	84
CONCLUSIÓN.....	94
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
ANEXOS.....	112
Anexo 1. Carta de consentimiento informado.	112
Anexo 2. Carta de asentimiento informado.	116
Anexo 3. Historia clínica.	119

RESUMEN

Antecedentes: La obesidad se ha asociado a un fenotipo único de asma no-alérgica; sin embargo, la plausibilidad biológica de esta asociación permanece incierta. RORC es el factor de transcripción maestro para la diferenciación de los linfocitos Th17, los cuales son la principal fuente de IL-17A. Nuestra hipótesis está a favor de los mecanismos inmunológicos del TNF- α y la IL-17A debido a que ambas citocinas orquestan la inflamación sistémica de la obesidad y causan un daño pulmonar en el asma. No obstante, dichas citocinas y el factor transcripcional podrían estar regulados por las modificaciones epigenéticas como la metilación en los promotores de sus genes.

Objetivo general: Evaluar la diferencia en las concentraciones séricas de TNF- α e IL-17A, la expresión génica y el grado de metilación en los promotores de los genes de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* en leucocitos de sangre periférica entre los grupos de adolescentes sanos, con asma alérgica sin obesidad, obesidad sin asma y asma no-alérgica con obesidad.

Metodología: Estudio transversal comparativo en cuatro grupos de adolescentes entre 11-18 años 1) adolescentes sanos (AS) (n=23), 2) asma alérgica sin obesidad (AA) (n=29), 3) obesidad sin asma (OB) (n=28), 4) asma no-alérgica con obesidad (ANA) (n=22). La cuantificación de las concentraciones de TNF- α y de IL-17A se realizaron por ELISA y la cuantificación de la expresión génica y el perfil de metilación por RT-qPCR.

Resultados: La edad, el sexo y el estadio de Tanner fueron similares entre los cuatro grupos. El índice de masa corporal (IMC), el percentil del IMC y el z-score del IMC fue mayor en el grupo de obesidad (OB y ANA) en comparación con los adolescentes eutróficos (AS y AA). Las concentraciones de TNF- α fue mayor en los ANA versus los AS, AA y OB. La expresión génica de *TNFA* fue superior en los ANA (2.1 (RIQ: 1.3-2.8) en comparación con los AS (0.9 (RIQ: 0.7-1.3), $p < 0.001$) y OB (1.0 (RIQ: 0.8-1.4), $p = 0.003$). Las concentraciones de IL-17A fue superior en los ANA en comparación con los AS y AA. La expresión génica de *IL17A* fue superior en los ANA (7.2 (RIQ: 5.8-8.3) versus los AS (0.7 (RIQ: 0.4-1.6), $p < 0.001$), AA (3.8 (IQR: 3.0-6.3), $p = 0.04$) y OB (3.9 (RIQ: 2.2-4.9), $p = 0.001$). La expresión génica de *RORC* fue mayor en los ANA (2.6 (IQR: 2.1-2.8) en comparación con los AS (1.0 (IQR: 0.6-1.4), $p < 0.001$), AA (1.6 (IQR: 1.0-2.3), $p = 0.04$) y OB (0.9 (IQR: 0.8-1.0), $p < 0.001$). El perfil de metilación en el promotor de *RORC* fue menor en los ANA (45.4% \pm 5.7) versus los AS (54.9% \pm 4.1, $p < 0.001$) y OB (50.2% \pm 4.4), $p = 0.02$). Reportamos una correlación negativa entre el perfil de metilación en el promotor de *RORC* y su expresión génica de *RORC* ($r_s = -0.38$, $p < 0.001$), y similarmente entre el perfil de metilación en el promotor de *RORC* y la expresión génica de *IL17A* ($r_s = -0.37$, $p < 0.001$) y con la expresión génica de *TNFA* ($r_s = -0.26$, $p = 0.009$). Interesantemente, el perfil de metilación en el promotor de *RORC* correlacionó positivamente con el perfil de metilación del promotor de *IL17A* ($r_s = 0.30$, $p = 0.003$) y con el de *TNFA* ($r_s = 0.26$, $p = 0.009$).

Conclusión: El presente estudio sugiere una asociación de las concentraciones de TNF- α y de IL-17A y de la expresión génica de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* con el fenotipo de asma no-alérgica asociado a la obesidad. Una regulación a la alta en la red transcripcional *RORC* podría jugar un papel fundamental en la plausibilidad biológica del asma asociado a la obesidad, y las modificaciones epigenéticas como un menor grado de metilación en el promotor de *RORC* podría explicar una mayor polarización del perfil Th17 en este fenotipo.

ABSTRACT

Associations of mRNA expression levels and the methylation profile in the *TNFA*, *IL17A* and *RORC* gene promoters in peripheral blood leukocytes with obesity-related asthma in adolescents.

Background: Obesity is associated with a unique non-allergic asthma phenotype; however, the biological plausibility of this association remains uncertain. RORC is the master transcription factor for Th17 differentiation. Our hypothesis favours immunological mechanisms of TNF- α and IL-17A because both cytokines are responsible for orchestrating systemic inflammation associated with obesity and lung damage. Nevertheless, these cytokines and this transcription factor are regulated by epigenetic modifications, such as gene promoter methylation.

Objective: To evaluate serum TNF- α and IL-17A levels, and mRNA expression levels and methylation profile in *TNFA*, *IL17A* and *RORC* genes promoters in peripheral blood leukocytes between the healthy adolescents, adolescents with allergic asthma without obesity, adolescents with obesity without asthma, and adolescents with non-allergic asthma with obesity.

Methods: We conducted a cross-sectional study in adolescents (11–18-year-old), subdivided as follows: healthy (HA), allergic asthma without obesity (AA), obesity without asthma (OB), and non-allergic asthma with obesity (NAO). Serum TNF- α and IL-17A levels were measured by ELISA, and *TNFA*, *IL17A*, and *RORC* mRNA expression and methylation profile were assessed by RT-qPCR.

Results: Age, sex, and Tanner stage were similar among the four groups. As expected, BMI, BMI%, and BMI z-score were significantly higher in the obese adolescents (NAO and OB groups) than in the subjects without obesity (HA and AA groups). Serum TNF- α levels were higher in the NAO than in the HA, AA, and OB. *TNFA* mRNA expression was higher in the NAO (2.1 (IQR: 1.3-2.8)) than in the HA (0.9 (IQR: 0.7-1.3), $p < 0.001$) or the OB (1.0 (IQR: 0.8-1.4), $p = 0.003$). Serum IL-17A levels were higher in the NAO than in the HA or the AA group. *IL17A* mRNA expression was higher in the NAO (7.2 (IQR: 5.8-8.3)) than in the HA (0.7 (IQR: 0.4-1.6), $p < 0.001$), the AA (3.8 (IQR: 3.0-6.3), $p = 0.04$), or the OB (3.9 (IQR: 2.2-4.9), $p = 0.001$). *RORC* mRNA expression was higher in the NAO group (2.6 (IQR: 2.1-2.8)) than in the HA (1.0 (IQR: 0.6-1.4), $p < 0.001$), the AA (1.6 (IQR: 1.0-2.3), $p = 0.04$), or the OB (0.9 (IQR: 0.8-1.0), $p < 0.001$). The methylation profile in the *RORC* gene promoter was lower in the NAO (45.4% \pm 5.7) than in the HA (54.9% \pm 4.1, $p < 0.001$) or the OB (50.2% \pm 4.4), $p = 0.02$). As expected, a negative correlation was found between methylation profile in the *RORC* gene promoter and *RORC* mRNA expression ($r_s = -0.38$, $p < 0.001$), and a similar correlation was also observed between methylation profile in the *RORC* gene promoter and *IL17A* mRNA expression ($r_s = -0.37$, $p < 0.001$). Moreover, a negative correlation was observed between methylation profile in the *RORC* gene promoter and *TNFA* mRNA expression ($r_s = -0.26$, $p = 0.009$). Interestingly, the methylation profile in the *RORC* gene promoter was positively correlated with the methylation profile in the *IL17A* gene promoter ($r_s = 0.30$, $p = 0.003$) and *TNFA* gene promoter ($r_s = 0.26$, $p = 0.009$).

Conclusion: The present study suggests a relationship between serum TNF- α and IL-17A levels and *TNFA*, *IL17A*, and *RORC* mRNA expression levels in obesity-related asthma. The RORC transcriptional network may play a critical role in the biological plausibility of non-allergic asthma-associated by obesity. The epigenetic modifications such as the methylation profile in the *RORC* gene promoter might explain the greater Th17 polarization of immune response observed in the non-allergic asthma with obesity group.

INTRODUCCIÓN

La obesidad y el sobrepeso son definidos como el cúmulo excesivo de grasa corporal que afecta a la salud y son actualmente un problema de salud pública en el mundo [1].

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) [1], cada año mueren como mínimo 2.8 millones de personas a causa de la obesidad y el sobrepeso. La incidencia a nivel global está incrementando, tanto en países desarrollados como en los de en vías de desarrollo y hasta el momento actual no existe ninguna intervención epidemiológica eficaz para disminuir su incidencia [2]. Finkelstein et al. [3] en un modelo matemático pronostica que para el año 2030 más del 51% de la población en todo el mundo podrían padecer obesidad.

El asma es un síndrome clínico caracterizado por un desorden complejo crónico de la vía aérea con obstrucción de esta, hiperreactividad bronquial e inflamación que se manifiesta por síntomas recurrentes de tos, sibilancias y disnea [4]. De acuerdo con la OMS 235 millones de personas en el mundo padecen de asma [5].

La obesidad causa un estado inflamatorio crónico de bajo grado, esta inflamación se ha asociado a diferentes enfermedades crónicas como diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, esteatosis hepática no alcohólica, asma no alérgica, neurodegeneración y ciertos tipos de cáncer [6-10].

Varios estudios han demostrado que la obesidad antecede al asma y que el incremento del índice de masa corporal (IMC) aumenta la razón de posibilidades (OR) de padecer asma [11-16]. Uno de los primeros estudios fue conducido por Camargo et al. [14] en una cohorte de 85,911 enfermeras entre 26-46 años, con un seguimiento por 4 años, demostró que la obesidad aumenta casi tres veces la posibilidad de padecer asma (OR: 2.7 (IC95%: 2.3-3.1, $p < 0.001$)).

Finalmente, la evidencia de esta asociación es más sólida en un meta-análisis por Beuther et al. [11] quien estudio 7 cohortes con un total de 333,102 adultos, cuando se estimó las posibilidades desarrollar asma en adultos con obesidad (IMC \geq 30) versus adultos con IMC normal, se estimó un OR de 1.92 (IC95%: 1.43–2.59, $p=0.0001$).

Respecto a la población pediátrica Castro-Rodríguez et al. [15] en una cohorte de 1,246 niños con un seguimiento de 7 años, demostró que las niñas entre los 6 a los 13 años que durante el seguimiento llegaban a padecer sobrepeso y obesidad tenían casi 7 veces más

posibilidad de desarrollar asma a los 13 años comparadas con las niñas que se mantuvieron en su peso normal (OR: 6.8 (IC95%: 2.4-19.4, $p < 0.01$)).

Finalmente, la asociación de asma y obesidad en población pediátrica se ha confirmado en tres meta-análisis; el primero por Chen et al. [12] de 3 cohortes con una muestra de 14,083 niños entre 5-18 años, se estimó un riesgo relativo (RR) de 2.02 (IC95%: 1.16-3.50, $p = 0.01$), el segundo meta-análisis por Egan et al. [13] en 2 cohortes con una muestra de 15,688 niños entre 8-18 años, se estimó un RR: 1.50 (IC95%: 1.22-1.83), y recientemente en un tercer meta-análisis por Deng X et al. [16] en 8 cohortes de 73,252 niños reportando un OR:1.40 (IC95%: 1.29-1.52, $p < 0.001$).

Actualmente se pretende clasificar el asma de acuerdo con su fenotipo con el propósito de individualizar el tratamiento para cada paciente, por lo tanto, es fundamental conocer cuáles son los mecanismos biológicos que causan el asma en cada fenotipo con el objetivo de ofrecer nuevas estrategias terapéuticas [17-19].

Holguin et al. [20] describió dos fenotipos de pacientes con asma y obesidad:

- a) **El fenotipo asmático tipo 2 o de inicio temprano:** En donde el asma se presenta antes de los 12 años y son los pacientes con asma alérgica clásica que ganaron peso durante el tiempo y desarrollaron obesidad, en este fenotipo predomina la clásica inflamación alérgica dependiente de los linfocitos Th2 y de las células innatas tipo 2 (ILC2), con una infiltración bronquial por eosinófilos y aumentos en las concentraciones séricas de interleucina (IL)-4, IL-5, IL-9, IL-13 e inmunoglobulina E específica [17-19].
- b) **El fenotipo asmático no-tipo 2 o de inicio tardío:** También conocido como fenotipo no-alérgico, en donde el asma aparece después de los 12 años, la obesidad siempre precede al asma y los mecanismos inmunológicos son diferentes; este grupo de pacientes desarrollan un perfil inmunológico con las citocinas del macrófago tipo 1 (M1), principalmente por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β , IL-6, IL-15 e IL-23 y las citocinas de los linfocitos Th17 y de las células innatas tipo 3 (ILC3) como la IL-17A, IL-17F, IL21 e IL-22; se caracteriza por la infiltración de neutrófilos en el epitelio respiratorio, es un asma clínicamente más grave, más común en mujeres y con resistencia a los esteroides inhalados [17, 21-23].

Está bien reconocido que hay una asociación entre la obesidad y un fenotipo único de asma no-alérgica, sin embargo, la plausibilidad biológica de esta asociación aun es incierta, se

han postulado diversos mecanismos como los inmunológicos, hormonales, metabólicos, mecánicos, ambientales, genéticos y epigenéticos [25,26].

Dentro de los mecanismos biológicos de este fenómeno no sabemos si hay un mecanismo más importante que otro, sin embargo, nuestra hipótesis está a favor de los mecanismos inmunológicos, porque son las citocinas como el TNF- α y la IL-17A las que orquestan la inflamación sistémica de bajo grado de la obesidad y las que causan un daño pulmonar importante en el asma [27,28]. Sin embargo, estas citocinas podrían estar reguladas por los mecanismos epigenéticos como la metilación de los promotores de sus genes [29].

MARCO TEÓRICO

El papel del tejido adiposo disfuncional en el asma no-alérgica asociada a la obesidad.

En humanos se han descrito dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo pardo y el tejido adiposo blanco [30]. El tejido adiposo pardo está localizado predominantemente en pequeñas cantidades en los niños recién nacidos y su principal función es la termogénesis. En cambio, el tejido adiposo blanco es la forma predominante en los adultos y es responsable del almacenamiento de energía y funciona como un órgano endocrino. Asimismo, el tejido adiposo blanco es el que se encuentra incrementado en la obesidad [30].

El tejido adiposo blanco en los individuos sanos está caracterizado en su mayoría por adipocitos y por macrófagos tipo 2 (M2), este tipo de macrófagos liberan citocinas antiinflamatorias como IL-10 y arginasa 1, de manera diferente en los pacientes con obesidad, la hipertrofia y la inflamación del tejido adiposo desencadena la muerte y necrosis de los adipocitos, que posteriormente serán reemplazados en su mayoría por macrófagos M1, de hecho el número de macrófagos M1 en los individuos con obesidad es aproximadamente el triple del que tendría un individuo sano, hay reportes que incluso llegan a establecer que la estirpe celular en el tejido adiposo del paciente con obesidad es igual o mayor al 40% de macrófagos M1, este hallazgo histológico es conocido como tejido adiposo disfuncional [30-33].

Los macrófagos M1 liberan citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL1- β , IL-6 y péptido quimiotáctico de monocitos tipo-1 (MCP)-1 induciendo una inflamación sistémica de bajo grado en la obesidad. [30-33].

El macrófago M1 es la estirpe celular más importante en la producción de TNF- α en la obesidad, su principal localización es el tejido adiposo visceral (TAV), [30-33]. Periyalil et al. [34]. demostró que en los sujetos adultos con asma y obesidad el número de macrófagos M1 en el TAV es mayor que en los sujetos con obesidad sin asma (2.43 millones células/ml vs 1.15 millones células/ml $p=0.039$), en este mismo estudio se observó que a mayor IMC, mayor cantidad de macrófagos M1 ($r=0.55$, $p=0.05$).

Kim et al. [35]. en un modelo murino demostró que la IL1- β estimula a las ILC3 induciendo la liberación de IL-17A, esta interleucina causa hiperreactividad bronquial y perpetua la

inflamación sistémica de bajo grado en el epitelio bronquial en el modelo del asma y obesidad [36,37] (Figura 1).

Sin embargo, las ILC3 no son las principales productoras de IL-17A en la biología humana, la principal fuente de IL-17A sérica son los linfocitos Th17 [38]. En el modelo del tejido adiposo disfuncional existe un ciclo inmunológico con una retroalimentación positiva entre el macrófago M1 y el linfocito Th17 [28] (Figura 2).

Figura 1. Mecanismos inmunológicos de la inflamación crónica de bajo grado de la obesidad en los pulmones en un modelo murino. Tomado de Leiria et al. [37].

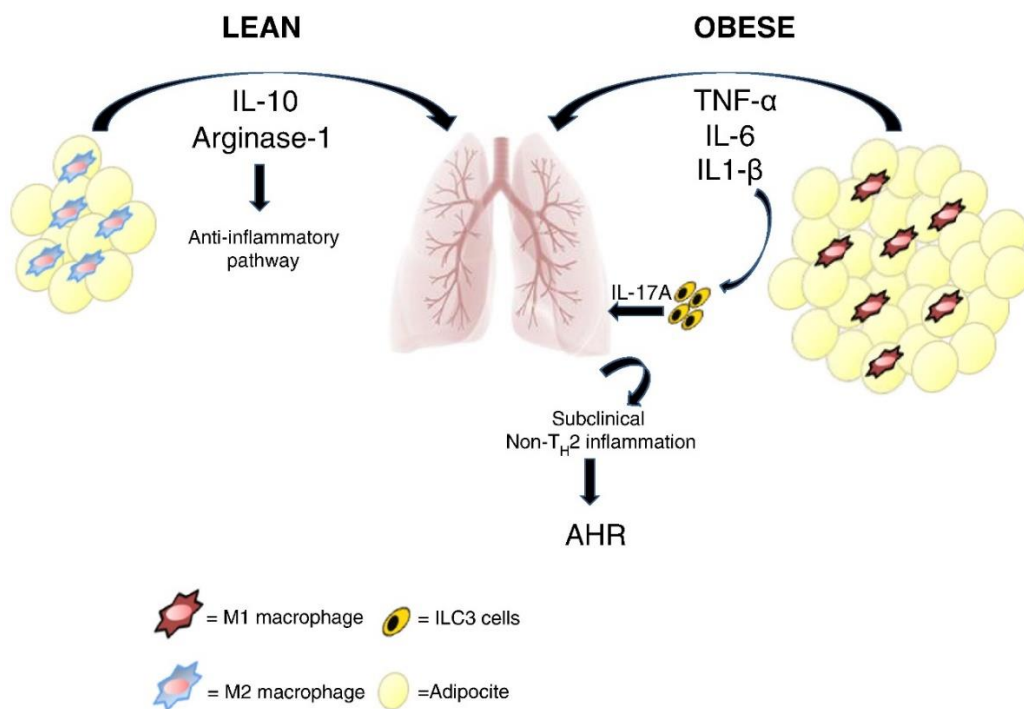


Figura 1. Mecanismos inmunológicos de la inflamación crónica de bajo grado de la obesidad en los pulmones en un modelo murino. En ratones sanos predominan los macrófagos tipo 2 (M2), los cuales liberan citocinas antiinflamatorias como IL-10 y arginasa-1, manteniendo una función pulmonar normal, mientras que en la obesidad los macrófagos tipo 1 (M1) liberan citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , induciendo una inflamación de bajo grado e hiperreactividad en el epitelio respiratorio. La IL-1 β induce la liberación de IL-17A de las células linfoides innatas tipo 3 (ILC3), en consecuencia, la IL-17A causa un daño e hiperreactividad en el epitelio respiratorio en el ratón con obesidad.

Para entender mejor como es la biología del ciclo entre el macrófago M1 y el linfocito Th17 en el tejido adiposo disfuncional, partimos de la premisa que la gran mayoría de la estirpe celular en el TAV son los macrófagos M1, productores de las interleucinas inflamatorias

como IL-1-β, IL-6 e IL-15 las cuales se dirigen a los receptores de los linfocitos T naïve CD4+ con la finalidad de diferenciarlos en linfocitos Th17 [28] (Figura 2).

Posteriormente los linfocitos Th17 diferenciados son activados por la IL-23, la cual es liberada por el macrófago M1, los nuevos linfocitos Th17 activados sintetizan IL-17A; la IL-17A activa a los macrófagos M1, quienes activos secretan IL1-β, IL-6, IL-15 e IL-23; nuevamente este grupo de citocinas van a polarizar y activar a más linfocitos Th17, cómo podemos apreciar hay un ciclo inmunológico entre el macrófago M1 y el linfocito Th17 estimulándose recíprocamente por medio de estas citocinas [28] (Figura 2).

Figura 2. Ciclo inmunológico con una retroalimentación positiva entre el macrófago tipo 1 y el linfocito Th17. Tomado de Chehimi et al. [28].

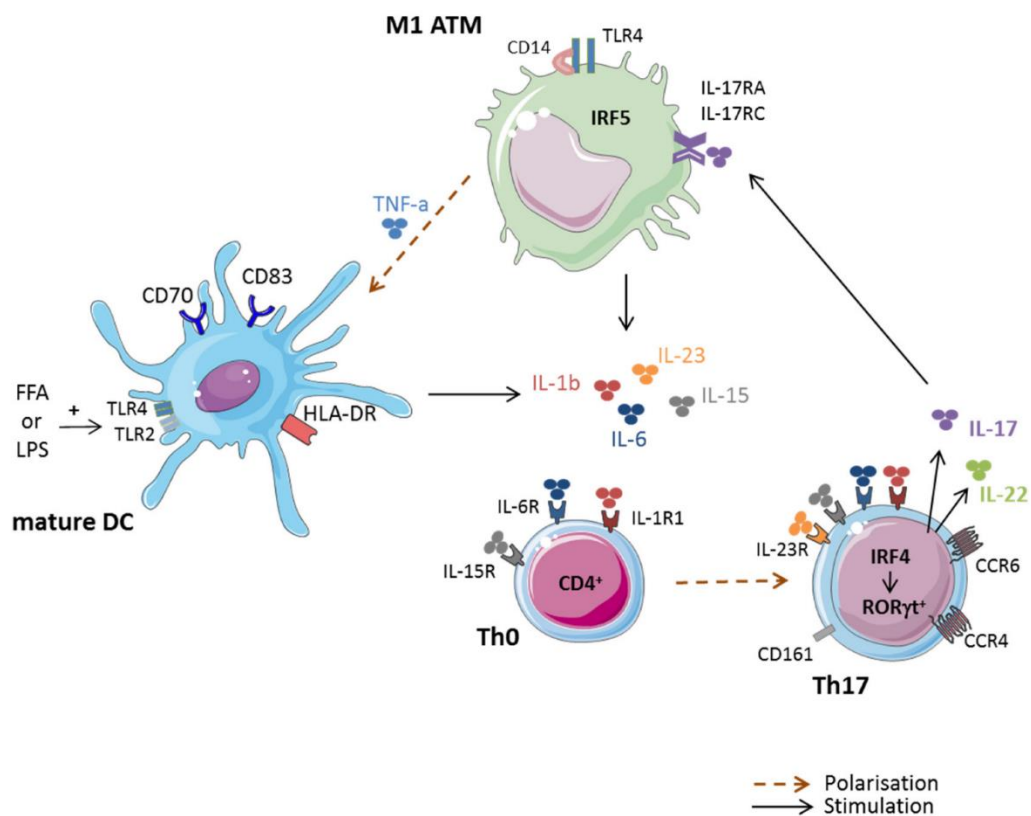


Figura 2. Ciclo inmunológico con una retroalimentación positiva entre el macrófago tipo 1 y el linfocito Th17. Entre el macrófago tipo 1 (M1) y el linfocito Th17 hay un ciclo inmunológico con una retroalimentación positiva señalado por las líneas sólidas. El macrófago M1 sintetiza citocinas proinflamatorias como IL-1β, IL-6 e IL-15, las cuales se dirigen a sus receptores para polarizar al linfocito T naïve CD4+ (Th0) hacia el linfocito Th17, posteriormente la IL-23, sintetizada por el macrófago M1, lo activa hacia un linfocito Th17 maduro con capacidad de sintetizar IL-17A. La IL-17A activa a los macrófagos M1, quienes activos secretan IL1-β, IL-6, IL-15 e IL-23; nuevamente este grupo de citocinas van a polarizar y activar a más linfocitos Th17.

Por otra vía inmunológica, la IL-17A activa a los macrófagos M1, quienes activos secretan TNF- α , así mismo el TNF- α activa a las células dendríticas maduras, las cuales producen IL-1- β , IL-6, y IL-23, estas interleucinas polarizan y activan a más linfocitos Th17 [39] (Figura 2).

Por estos mecanismos es posible que las concentraciones séricas de TNF- α y de IL-17A son mayores en los individuos con obesidad, desencadenando un estado inflamatorio de bajo grado con repercusión en los diferentes órganos y sistemas, para el caso de nuestra hipótesis nos enfocaremos en el epitelio respiratorio [28].

Mecanismos moleculares para la diferenciación y activación del linfocito Th17.

Para llevar a cabo la diferenciación y activación del linfocito T naïve CD4+ hacia un linfocito Th17 maduro se efectúa por medio de dos mecanismos; el primer mecanismo es bien conocido por la clásica vía inmunológica por medio de las interleucinas inflamatorias como la IL-6, TGF- β , IL-21 e IL-23, cada una de ellas se une a su propio receptor en el linfocito T naïve CD4+, y el segundo mecanismo es por medio de los ácidos grasos [40-47] (Figura 2).

Inicialmente la IL-6 y el TGF- β polarizan la respuesta inmunológica hacia el perfil Th17 y posteriormente la IL-21 prolifera los linfocitos Th17, finalmente la IL-23 los activa hacia unos linfocitos Th17 maduros con la capacidad de sintetizar las interleucinas específicas del perfil Th17 [40-47] (Figura 2).

La IL-6 tiene un papel fundamental en la diferenciación del linfocito Th17. En el linfocito T naïve CD4+ la IL-6 se une a su receptor IL-6R y a la glicoproteína 130, las cuales activan río abajo a JAK1/JAK2. JAK1 y JAK2 activas fosforilan directamente al transductor de señal y activador de transcripción 3 (signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) por su nombre y siglas en inglés) y este activador de señales se une directamente a la cromatina del linfocito T naïve CD4+ y activa la expresión del ARN mensajero (ARNm) del receptor-C huérfano relacionado con el ácido retinoico (retinoid-related orphan receptor-C (RORC) por su nombre y sus siglas en inglés). El factor de transcripción RORC forma un complejo con un co-activador de histonas acetiltransferasa p300, este complejo se une a la cromatina del linfocito T naïve CD4+ y estimula la expresión génica de *IL17A*, *IL17F* y *IL23R*. Al final del proceso tenemos un linfocito Th17 totalmente diferenciado [48,49] (Figura 3).

Figura 3. Mecanismos moleculares para la diferenciación y activación del linfocito Th17. Tomado y adaptado de Leija-Martínez et al. [51].

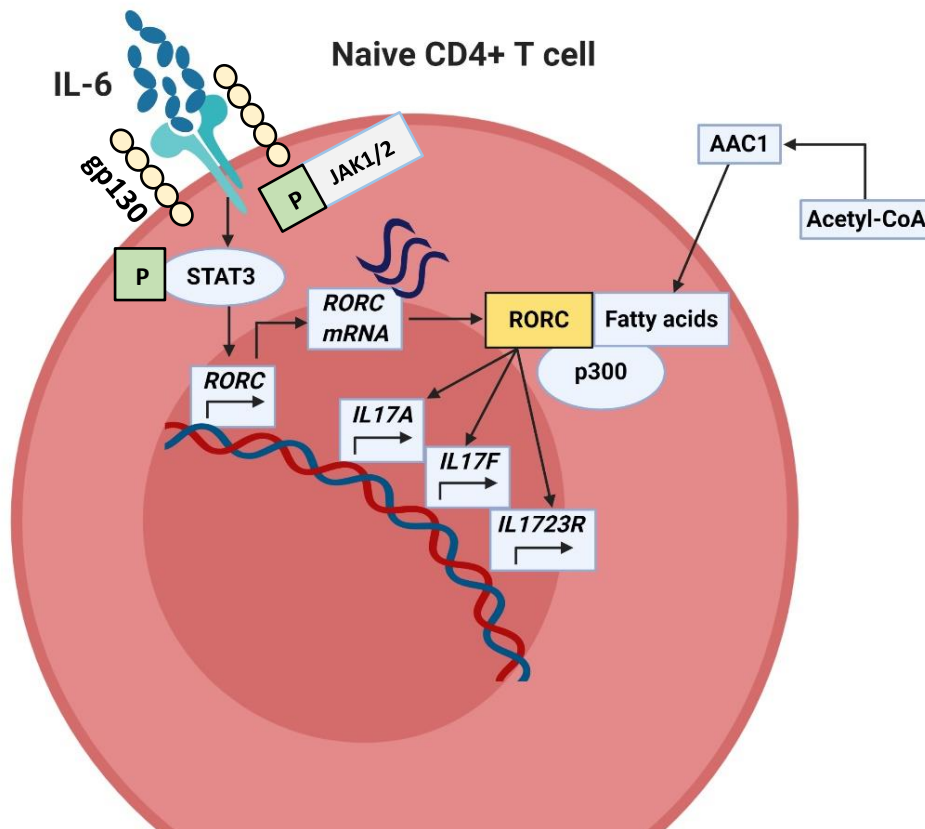


Figura 3. Mecanismos moleculares para la diferenciación y activación del linfocito Th17. El primer mecanismo es por la clásica vía inmunológica, la IL-6 se une a su receptor IL-6R y a gp130, activando río abajo a JAK1/JAK2, las cuales fosforilan al transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3), y este se une directamente a la cromatina del linfocito T naïve CD4+ y activa la expresión del ARN mensajero (ARNm) del receptor-C huérfano relacionado con el ácido retinoico (*RORC*). El segundo mecanismo ocurre por medio de la enzima acetil-CoA carboxilasa-1 (*ACC1*) que sintetiza los ácidos grasos y estos activan directamente a RORC como un ligando dependiente. Finalmente, en ambos mecanismos, RORC forma un complejo con un co-activador de histonas acetiltransferasa (p300). Este complejo se une a la cromatina del linfocito T naïve CD4+ para estimular la expresión génica de *IL17A*, *IL17F* e *IL23R*. Al final del proceso tenemos un linfocito Th17 bien diferenciado.

El segundo mecanismo para la diferenciación y activación del linfocito Th17 es descrito por Endo et al. [47] por medio de la enzima acetil-CoA carboxilasa-1 (acetyl-CoA carboxylase 1 (*ACC1*) por su nombre y siglas en inglés), enzima clave para la síntesis de los ácidos grasos monoinsaturados y oxisteroles, en los pacientes con obesidad la expresión de la enzima AAC1 se encuentra incrementada, por lo tanto la síntesis y las concentraciones séricas de los ácidos grasos van a estar elevadas, los ácidos grasos activan directamente al factor de

transcripción RORC como un ligando dependiente, RORC activo forma un complejo con un co-activador de histonas de acetiltransferasa p300, este complejo facilita la unión con la cromatina del linfocito Th17 y estimula la expresión génica de *IL17A*, *IL17F* e *IL23R* [49] (Figura 4).

Figura 4. Mecanismos moleculares para la diferenciación del linfocito Th17 por medio de los ácidos grasos. Tomado de Endo et al. [47].

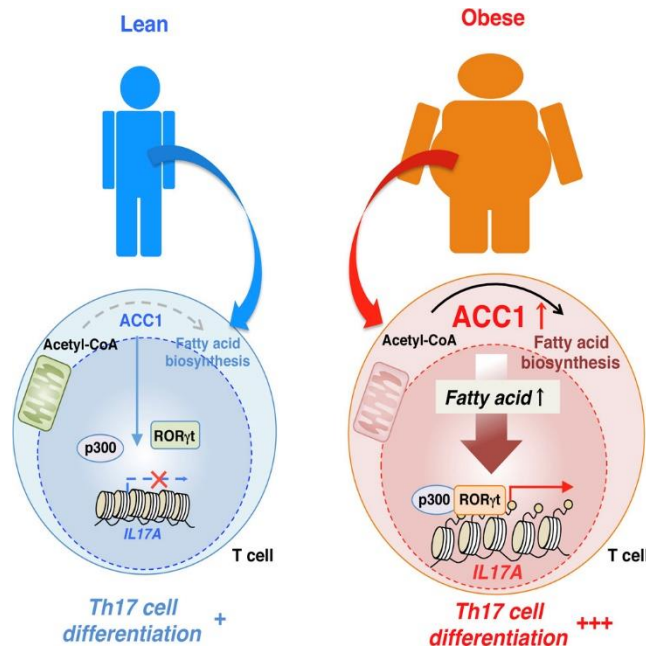


Figura 4. Mecanismos moleculares para la diferenciación del linfocito Th17 por medio de los ácidos grasos. La enzima acetil-CoA carboxilasa-1 (ACC1) juega un papel fundamental en la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados y oxisteroles, los ácidos grasos activan directamente al factor de transcripción RORC como un ligando dependiente, RORC activo forma un complejo con un co-activador de histonas de acetiltransferasa p300, este complejo facilita la unión con la cromatina del linfocito T naïve CD4+ y estimula la expresión génica de *IL 17A*. Al final del proceso habrá un linfocito Th17 bien diferenciado.

RORC en el humano y RORyt en el ratón es el factor de transcripción maestro para la diferenciación y activación de los linfocitos Th17, Du et al. [50] en un modelo murino demostró que una deficiencia de RORyt causa una reducción del 80% en la diferenciación de los linfocitos Th17 [52,53].

RORC/RORyt es expresado en todas las células productoras de IL-17A tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa. Dentro de la inmunidad adaptativa destacan principalmente los linfocitos Th17, Th17/Th1, Th1 no-clásicos y las células T citotóxicas (Tc17), y de la inmunidad innata tenemos predominantemente a las ILC3, células

$\gamma\delta$ T17, células T invariantes natural killer (iNKT), natural killer (NK), y las células inductoras de tejido linfoide (LTi). Sin embargo, la principal fuente de IL-17A en la biología humana y en la obesidad son los linfocitos Th17 y las ILC3 [38].

TNF- α en el asma no-alérgica asociado a la obesidad.

Varios autores han asociado al TNF- α a la obesidad, Aygun et al. [54] en Turquía, demostró que las concentraciones séricas de TNF- α en preadolescentes con obesidad fueron significativamente mayores comparado con los preadolescentes sanos (9.2 pg/ml \pm 2.3 vs 3.9 pg/ml \pm 1.0, $p < 0.001$, respectivamente), más estudios sobre las concentraciones séricas de TNF- α en la obesidad se realizaron en adolescentes por otros autores y en otros países como Shin et al. [55] en Korea y Reinehr et al. [56] en Alemania obteniendo resultados similares.

Shin et al. [55] demostró que a mayor IMC son mayores las concentraciones séricas de TNF- α con una correlación positiva entre ambas variables ($r = .39$, $p < 0.01$), por otro lado, sus concentraciones séricas disminuyen con la pérdida de peso, podemos observar que entre la obesidad y el TNF- α hay un gradiente biológico [57].

La expresión génica de *TNFA*; gen que codifica a TNF- α , también ha sido estudiado en la obesidad, Hotamisligil et al. [58] demostró que la expresión génica de *TNFA* en el tejido adiposo fue mayor en mujeres con obesidad versus mujeres sanas (56.9% standard \pm 18.6 vs 21.9% standard \pm 10.4, $p < 0.001$). Las mujeres con obesidad expresaban 2.5 veces más ARNm de *TNFA* en el tejido adiposo en comparación con las mujeres sanas.

En conclusión, los individuos con obesidad tienen mayor expresión génica y concentraciones séricas de TNF- α comparado con los individuos sanos, por lo tanto, es probable que los pacientes con ambas condiciones, los pacientes con asma no-alérgica asociada a la obesidad tienen mayor expresión génica y concentraciones séricas de TNF- α en comparación con los individuos sanos, con obesidad sin asma y asma alérgica clásica sin obesidad [51].

El estudio de Rastogi et al. [59] en adolescentes apoya parcialmente esta hipótesis, ese estudio demostró que las concentraciones de TNF- α son superiores en los en adolescentes con asma y obesidad en comparación únicamente con los adolescentes con asma sin obesidad, $p < 0.05$; de manera similar un segundo estudio de Rastogi et al. [60] en niños apoya también parcialmente esta hipótesis, ese estudio reportó que las concentraciones

séricas de TNF- α son mayores en niños con asma y obesidad en comparación con los niños sanos $p < 0.05$.

En ambos estudios de Rastogi et al. [59,60] no especifican si los pacientes con obesidad y asma son alérgicos o no-alérgicos, ni tampoco la temporalidad; no menciona si la obesidad precedió al diagnóstico de asma. En los estudios de asma y obesidad es muy importante clarificar si la obesidad antecede el asma, y si es el asma es de característica alérgica o no-alérgica para poder clasificar con mayor validez el fenotipo asmático no-tipo 2.

IL-17A en el asma no-alérgica asociada a la obesidad.

En la obesidad el perfil inmunológico que predomina es el Th17, Sumarac-Dumanovic et al. [61] demostró que las concentraciones séricas de IL-17A son mayores en mujeres con obesidad comparada con mujeres con peso normal, $p = 0.002$. Zapata-González et al. [62] demostró que la expresión génica de *IL17A* en el TAV fue prácticamente indetectable en las mujeres con peso normal, mientras que en las mujeres con obesidad mórbida fue significativamente mayor $p = 0.0127$.

En niños se han reportado resultados similares, Łuczyński et al. [63] reportó que la proporción de linfocitos Th17 en sangre periférica en niños con obesidad es mayor en comparación con los sanos (0.1000 vs 0.0390, $p = 0.0153$, respectivamente), otros autores han encontrado hallazgos similares, Schindler et al. [64] demostró que la proporción de linfocitos Th17 en sangre periférica es mayor en niños que padecen sobrepeso comparado con los niños sanos ($34.7\% \pm 1.5$ vs $25.4\% \pm 2.4$, $p = 0.0023$, respectivamente), además la proporción de linfocitos Th17 se asocia positivamente al IMC ($r = 0.42$, $p = 0.0005$), podemos observar que hay un gradiente biológico entre el IMC y los linfocitos Th17, el mismo autor demostró que la expresión génica de *IL17A* y de *RORC* fue mayor en los niños con sobrepeso en comparación con los de peso normal ($p = 0.014$; $p = 0.013$, respectivamente).

Es claro que el perfil inmunológico que predomina en la obesidad es el Th17, y por lo tanto, podemos inferir que los pacientes con asma no-alérgica asociada a la obesidad, podrían tener mayores concentraciones séricas de IL-17A y mayor expresión génica de *IL17A* y *RORC*, comparado con los individuos sanos, con obesidad sin asma y asma alérgica clásica sin obesidad [51].

En un modelo murino Mathews et al. [65] comparó dos grupos de ratones (cepa C57BL/6J), a un grupo se le indujo obesidad por medio de una dieta rica en grasa y el otro se alimentó

con una dieta adecuada por 24 semanas. Ese estudio demostró que la síntesis de IL-17A antecede a la hiperreactividad bronquial, y que además en el lavado bronquioalveolar la expresión génica de *IL17A* y la proporción de linfocitos Th17 fueron superiores en los ratones con obesidad e hiperreactividad bronquial en comparación con los ratones sanos.

En humanos Marijsse et al. [66] reportó que los adultos con asma y obesidad tienen una mayor expresión génica de *IL17A* en esputo en comparación con los adultos con asma sin obesidad (5.74 (IC95%: 3.01–8.45) vs 1.65 (IC95%: 0.49–5.27), $p=0.003$, respectivamente). Otro hallazgo importante en el estudio de Marijsse et al. [66], fue la correlación positiva entre el IMC y la expresión génica de *IL17A* ($r=0.22$; $p=0.009$).

Similarmente, estudios en niños asmáticos entre 7-8 años en China, Wu et al. [67] demostró que los niños asmáticos con sobrepeso/obesidad la expresión génica de *IL17A* y *RORC* en células mononucleares de sangre periféricas eran superiores en comparación con los niños con asma sin sobrepeso/obesidad ($p<0.001$; $p<0.05$, respectivamente).

En contraste a los estudios previamente mencionados, Rastogi et al. [59] en adolescentes demostró que las concentraciones séricas de IL-17A no eran superiores en los adolescentes con asma y obesidad versus los grupos de adolescentes sanos, con obesidad sin asma y asma sin obesidad, $p=0.85$.

En los estudios por Marijsse et al. [66], Wu et al. [67] y Rastogi et al. [59,60] no especifican si los pacientes con asma y obesidad son del fenotipo no-alérgico, y si los pacientes con asma sin obesidad son alérgicos, asimismo tampoco especifica la temporalidad; si la obesidad precedió al inicio del asma.

De manera diferente a Rastogi et al. [59] en adolescentes, el estudio de Dias et al. [68] en adultos demostró que los pacientes con asma y sobrepeso/obesidad tienen mayores concentraciones de IL-17A en comparación con los adultos sanos ($p<0.001$), con asma alérgica sin sobrepeso/obesidad ($p=0.028$) y sobrepeso/obesidad sin asma ($p=0.0011$), no obstante el grupo de asma con sobrepeso/obesidad se clasificaron como alérgicos con pruebas cutáneas positivas, por lo tanto no es precisamente el fenotipo de asma no-alérgica asociado a la obesidad descrito por Holguin et al. [20] que es el fenotipo que se estudió en el presente proyecto.

La biología del TNF- α y la IL-17A en el asma.

Como podemos apreciar en la Figura 5, el TNF- α causa un daño directamente en el epitelio respiratorio, este responde incrementando la producción de mucina y liberando más citocinas inflamatorias como IL-8, factor estimulante de las colonias de los granulocitos-macrófagos (GM-CSF), RANTES y moléculas de adhesión intercelular (ICAM) [69] En el endotelio vascular pulmonar el TNF- α regula positivamente la producción de la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1), el cual es un potente factor quimiotáctico de los eosinófilos en el epitelio respiratorio.

Asimismo, el TNF- α estimula directamente a los miofibroblastos y fibroblastos, este grupo de células iniciara una mayor síntesis de colágena. Adicionalmente, el TNF- α tiene un efecto indirecto en la remodelación bronquial, induciendo la liberación de las metaloproteinasas-9 (MMP)-9 por los eosinófilos; como resultado, las MMP-9 estimulan la síntesis de glicosaminoglicanos por los fibroblastos pulmonares. Al final de este proceso tendremos una vía respiratoria con fibrosis, el paciente asmático ha llegado a presentar una remodelación bronquial, con un grave deterioro en su función pulmonar y con un daño irreversible de la misma [70-73] (Figura 5).

Las concentraciones de TNF- α están asociados a complicaciones asmáticas, Berry et al. [74] demostró que los pacientes adultos con asma refractaria expresan mayor cantidad de receptores de TNF- α , mayor unión a membrana por TNF- α en monocitos periféricos e incremento en las concentraciones de la enzima convertidora de TNF- α . De manera similar, Brown et al. [75] demostró que las concentraciones séricas de TNF- α son mayores en adolescentes con asma grave en contraste con los adolescentes con asma leve bien controlada.

El TNF- α estimula la síntesis de IL-8 y esta interleucina es un potente quimiotáctico de los neutrófilos en el pulmón [76], la neutrofilia en el epitelio respiratorio está asociado a un asma grave [77-79], con resistencia a los esteroides inhalados [80] y a muerte [81].

Como podemos apreciar en la Figura 5 la IL-17A actúa directamente en el musculo liso y en el epitelio respiratorio ocasionando hiperreactividad bronquial, su principal papel biológico en el asma es el reclutamiento de los neutrófilos en el epitelio respiratorio por medio de IL-8, IL-6, IL-11, GM-CSF y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), estas citocinas inflamatorias son liberadas por las células del epitelio respiratorio, células musculares lisas y fibroblastos, asimismo la IL-17A incrementa las elastasas y

mieloperoxidasas contenidas en los gránulos de los neutrófilos [82,83] otros estudios han demostrado que la IL-17A estimula la expresión de genes de mucina en las células del epitelio bronquial y la activación del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) por los fibroblastos pulmonares, como resultado habrá una fibrosis y una remodelación con un daño irreversible de la vía aérea [84] (Figura 5).

Figura 5. La biología del TNF- α y de la IL-17A en el asma. Tomado de Leija-Martínez et al. [51].

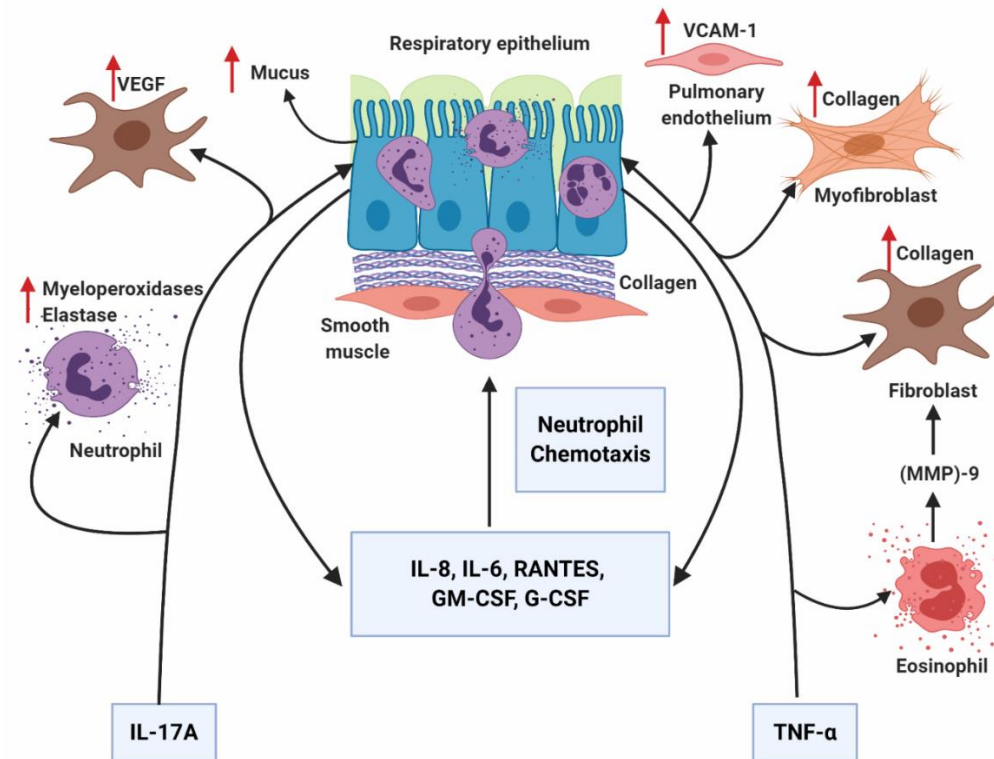


Figura 5. La biología del TNF- α y de la IL-17A en el asma. El TNF- α y IL-17A causan un daño directo al epitelio respiratorio, este responde produciendo moco y citocinas inflamatorias como IL-8, IL-6, RANTES, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y factor estimulante de granulocitos (G-CSF), como resultado habrá una quimiotaxis de neutrófilos en el epitelio respiratorio, liberando elastasas y mieloperoxidasas de sus gránulos, ocasionando un grave daño estructural. El TNF- α estimula la producción de colágena directamente del fibroblasto y miofibroblasto y de manera indirecta por medio de la metaloproteinasasa-9 (MMP)-9 del eosinófilo, adicionalmente también estimula la síntesis de las moléculas de adhesión vascular-1 (VCAM-1) por el endotelio vascular pulmonar. La IL-17A estimula la producción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) por el fibroblasto. Todos estos mecanismos finalizan en fibrosis y remodelación bronquial.

Es bien conocido que la IL-8 es la citocina más importante en el reclutamiento y quimiotaxis de los neutrófilos en el epitelio respiratorio [76], Laan et al. [85] demostró que la IL-17A

induce la liberación de IL-8 por el epitelio respiratorio, asimismo varios autores han reportado resultados similares; por ejemplo el estudio de Bullens et al. [86] en esputo de pacientes asmáticos, demostró una correlación positiva entre la IL-17A y la expresión génica de *CXCL8 (IL8)* ($r=0.37$, $p=0.03$), y entre la expresión génica de *IL17A* y el porcentaje de neutrófilos ($r=0.44$, $p=0.02$).

Laan et al. [87] en un experimento en vitro demostró que el TNF- α más la IL-17A se potencian y liberan mayores concentraciones de IL-8 del epitelio respiratorio versus IL-17A o TNF- α de manera individual.

Jovanovic et al. [88] demostró que los monocitos de sangre periférica al incubarlos con IL-17A recombinante responden con una expresión génica de *TNFA* a las 6 horas de incubación y con una síntesis de TNF- α a las 24 horas. Un estudio por Jones et al. [89] reportó que al incubar células de epitelio respiratorio con IL-17A por 48 horas se observó una estimulación en la expresión génica de *CXCL8 (IL8)* y *CSF3 (G-CSF)*, asimismo otro hallazgo importante fue que la IL-17A mejora sinérgicamente la liberación de IL-8 y G-CSF inducida por el TNF- α sobre las células del epitelio respiratorio.

Como podemos observar en los estudios previos; el TNF- α y la IL-17A juegan un papel de retroalimentación positiva para estimularse recíprocamente, ambas citocinas estimulan la producción de IL-8 por el epitelio respiratorio, y en consecuencia habrá un reclutamiento importante de neutrófilos, y como resultado un grave daño pulmonar irreversible (Figura 5)

La IL-17A se asocia con la gravedad de la enfermedad, el estudio de Agache et al. [90] demostró que las concentraciones séricas de IL-17A son significativamente mayores en los pacientes con asma grave (24.72 ± 4.87 pg/ml) en comparación con los de asma leve (14.21 ± 3.62 pg/ml) y moderada (12.22 ± 3.71 pg/ml).

La IL-17A se ha asociado con la resistencia al tratamiento con esteroides, los esteroides no disminuyen la producción de IL-17A en modelos in vitro [91], así como la neutrofilia y los linfocitos Th17 en modelos in vivo, Chambers et al. [92] demostró que los pacientes adultos con asma resistente a los esteroides inhalados tienen mayores concentraciones séricas de IL-17A comparado con los pacientes con buena respuesta a los mismos (47.0 pg/ml vs 11.3 pg/ml, $p=0.007$, respectivamente).

Por lo expuesto, se puede inferir que la vía inflamatoria del TNF- α e IL-17A sería la vía común tanto para la obesidad como para el asma, ambas interleucinas están asociadas a la neutrofilia en el epitelio respiratorio y como resultado a un asma de mayor gravedad con

resistencia a los esteroides inhalados y a muerte, lo que sugiere que el asma no-alérgica asociada a la obesidad es un fenotipo auténtico y diferente del asma alérgica clásica; por lo tanto se debería abordar y tratar de manera diferente en la práctica clínica.

La metilación del ADN y la regulación de la expresión génica.

El término epigenética denota la transmisión y la perpetuación de la información genética mediante mecanismos que no están basados en la secuencia del ácido desoxiribonucleico (ADN) sino en un cambio en la metilación del ADN o en la modificación post-transduccional de las proteínas asociadas al ADN como las histonas [93,94].

Como podemos apreciar en la Figura 6, la metilación puede regular directamente la expresión de un gen mediante la adición de un grupo metilo (CH₃) procedente de la S-adenosilmetionina (SAM) por medio de la ADN-metiltransferasa al carbono 5 de la citosina del dinucleótido CpG (CpG), dando como resultado la 5-metilcitosina y la S-adenosilhomocisteína (SAH) [94].

Figura 6. Reacción de metilación del ADN y formación de la 5-metilcitosina. Tomado de Attwood et al. [94].

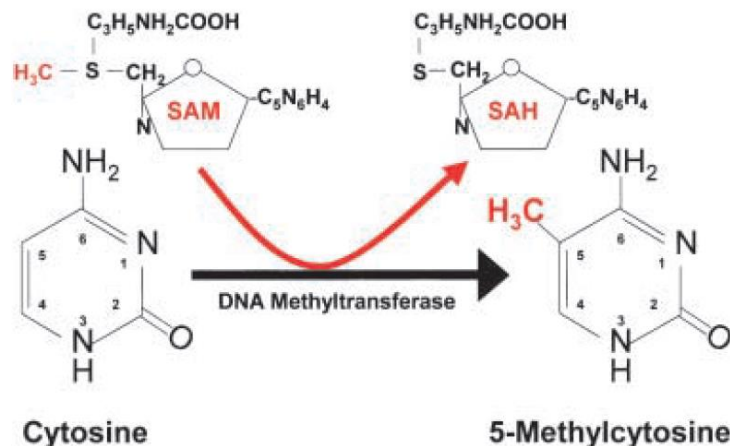


Figura 6. Reacción de metilación del ADN y formación de la 5-metilcitosina. La adición de un grupo metilo (CH₃) procedente de la S-adenosilmetionina (SAM) por medio de la ADN-metiltransferasa al carbono 5 de la citosina da como resultado la 5-metilcitosina y S-adenosilhomocisteína (SAH).

Posteriormente como podemos ver en la Figura 6, la 5-metilcitosina inhibe la expresión génica al bloquear la unión de los factores de transcripción o bien formando complejos

proteicos que impiden la unión de los factores de transcripción al ADN; como resultado, los dinucleótidos CpG en los promotores de los genes van a estar metilados, las histonas desacetiladas y la cromatina condensada (inactiva); en conclusión, tendremos un gen silenciado sin expresión génica. De manera contraria un gen en donde los dinucleótidos CpG en la región promotora de los genes se encuentran sin metilación, con histonas acetiladas y una cromatina abierta (activa) tendremos un gen activo y por lo tanto una mayor expresión génica [93,94] (Figura 7).

Figura 7. Mecanismos de inhibición de la expresión génica por medio de la metilación del ADN. Tomado de Attwood et al. [94].

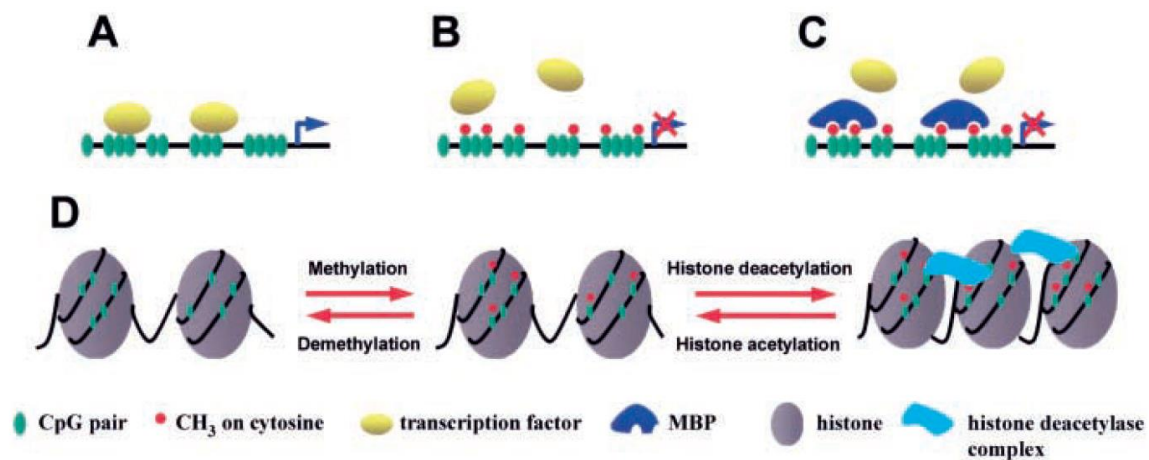


Figura 7. Mecanismos de la inhibición de la expresión génica por medio de la metilación del ADN. (A): La hipometilación de los dinucleótidos CpG (CpGs) en los promotores de los genes permite la unión de los factores de transcripción y en consecuencia tendremos una expresión génica. (B): La metilación de los CpGs inhibe la unión de los factores de transcripción en los promotores de los genes y como resultado se inhibe la expresión génica. (C): El complejo formado por la presencia de proteínas unidas a la 5-metilcitosina (MBPs) y a los CpGs en los promotores de los genes bloquea la unión de los factores de transcripción a las regiones promotoras, y como resultado se inhibe la expresión génica. (D): En la región promotora las MBPs y las CpGs unidas forman un complejo con la enzima histona-desacetilasa; como resultado las histonas estarán desacetiladas, la cromatina condensada (inactiva), y en consecuencia la expresión génica estará silenciada.

El papel de la metilación del ADN en la diferenciación de los linfocitos Th17.

En el estudio de Mazzoni et al. [95] podemos apreciar la importancia de la metilación de los genes en la diferenciación del linfocito T naïve CD4+ hacia un linfocito Th17 maduro; en ese estudio se comparó el perfil de metilación en los promotores de los genes de *RORC* e

IL17A en 5 diferentes tipos de linfocitos; T naïve CD4+, Th17, Th17/Th1, Th1 no clásico y Th1 clásico. Sin embargo, nos enfocaremos únicamente en los linfocitos T naïve CD4+ y Th17, los cuales son los que están involucrados en el proceso de la diferenciación del linfocito Th17, asimismo el linfocito Th17 es la principal fuente de IL-17A en la biología humana.

Como podemos apreciar en la Figura 8, en los linfocitos Th17 el perfil de metilación en el promotor de *IL17A* fue muy bajo, prácticamente sus sitios CpG están desmetilados, de manera diferente en los linfocitos T naïve CD4+, el perfil de metilación fue significativamente mayor (~2% vs ~87%, respectivamente).

Figura 8. Perfil de metilación en el promotor de *IL17A* en los linfocitos T naïve CD4+ y Th17. Tomado de Mazonni et al. [95].

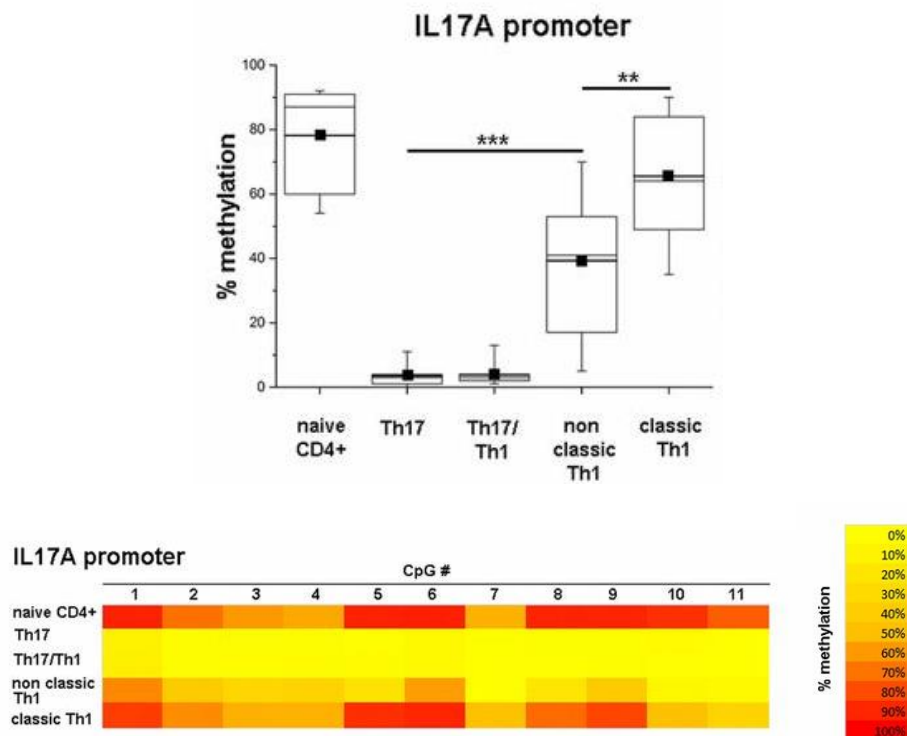


Figura 8. Perfil de metilación en el promotor de *IL17A* en los linfocitos T naïve CD4+ y Th17. El color naranja representa el porcentaje metilado en los sitios CpG en el promotor de *IL17A*, y el color amarillo el porcentaje no metilado; el color amarillo es el que predomina en los promotores de los linfocitos Th17, la mayoría de los sitios CpG no están metilados en comparación con los linfocitos T naïve CD4+, en donde predomina el porcentaje metilado en color naranja.

En el mismo estudio, el perfil de metilación en el promotor de *RORC* en los linfocitos Th17 fue muy bajo, prácticamente sus sitios CpG se encuentran desmetilados, de manera diferente en el promotor de *RORC* en los linfocitos T naïve CD4+ el perfil de metilación fue significativamente mayor (~1% vs ~62%, respectivamente) (Figura 9).

Figura 9. Perfil de metilación en el promotor de *RORC* en los linfocitos T naïve CD4+ y Th17. Tomado de Mazzoni et al. [95].

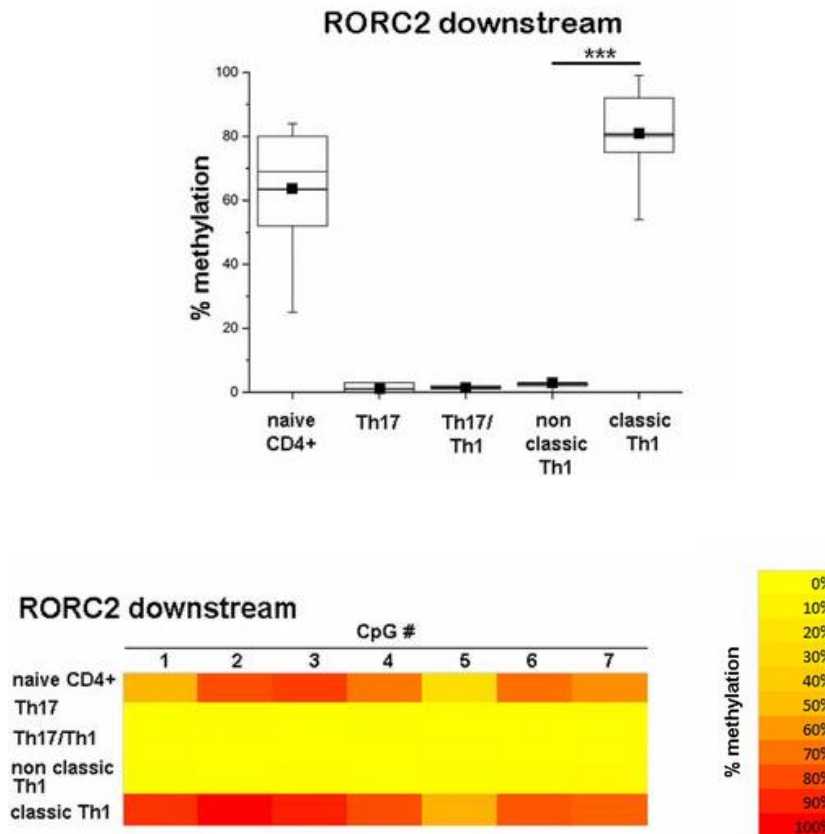


Figura 9. Perfil de metilación en el promotor de *RORC* en los linfocitos T naïve CD4+ y Th17.

El color naranja representa el porcentaje metilado en los sitios CpG en el promotor de *RORC*, y el color amarillo el porcentaje no metilado; el color amarillo es el que predomina en los promotores de los linfocitos Th17, la mayoría de los sitios CpG no están metilados en comparación con los linfocitos T naïve CD4+, en donde predomina el porcentaje metilado en color naranja.

Está bien estudiado que RORC es el factor de transcripción maestro para la diferenciación de los linfocitos Th17, y que en un modelo murino se demostró que una deficiencia de este factor (*RORγt*) puede inhibir el 80% de su diferenciación [50]; en el estudio de Mazzoni et

al. [95] podemos concluir que la modificación en la metilación en el promotor de *RORC* es un mecanismo biológico fundamental para la diferenciación de los linfocitos Th17.

Dado que en el fenotipo asmático no-tipo 2 podría predominar el perfil inmunológico del macrófago M1 y el linfocito Th17, es lógico postular que en los pacientes con asma no-alérgica asociado a la obesidad el perfil de metilación en los promotores de los genes de *TNFA*, *RORC* e *IL17A* en los leucocitos de sangre periférica será significativamente menor en comparación con los individuos sanos, con obesidad sin asma y asma alérgica clásica sin obesidad [51].

Metilación del ADN en el asma alérgica.

Respecto al patrón de metilación del ADN en asma alérgica, Kwon et al. [96] demostró que el perfil de metilación en el sitio CpG localizado a -80 kb en el promotor del gen *IL4*, regula la expresión génica y las concentraciones séricas de IL-4, y que a mayor porcentaje de citosinas no metiladas en el promotor, son mayores las concentraciones séricas de IL-4 ($r=0.727$, $p=0.026$).

Otros autores [97-102] han demostrado que un bajo perfil de metilación en los promotores de los genes de *IL-4*, *IL-4R*, *IL-5R*, *IL-13*, *STAT6* y *GATA3*, y un alto perfil de metilación en el promotor del gen *IFNG* [103] se ha asociado con asma alérgica con una respuesta inmune Th2.

Metilación del ADN en el asma no-alérgica asociada a la obesidad.

Algunos autores han realizado estudios de metilación de los genes en pacientes con asma y obesidad, pero la técnica de metilación que han utilizado no ha permitido evaluar específicamente los promotores de los genes de *TNFA*, *IL17A* y *RORC*.

Rastogi et al. [104] en Nueva York, USA, en un estudio piloto, analizó la diferencia en el patrón de metilación de los genes en células mononucleares de sangre periférica en cuatro grupos de adolescentes afroamericanos e hispanos; 1) adolescentes sanos (n=8), 2) asma sin obesidad (n=8), 3) obesidad sin asma (n=8) y 4) asma con obesidad (n=8)

El estudio de Rastogi et al. [104]. demostró que los adolescentes con asma y obesidad tienen un incremento en el perfil de metilación en el promotor del gen de *FCER2* (receptor de baja afinidad para la inmunoglobulina E), y en el promotor del gen de *TGFB1* (factor de crecimiento transformante β ; un inhibidor de la respuesta los linfocitos T cooperadores).

Los hallazgos de Rastogi et al. [104] apoyan nuestra hipótesis, en donde los mecanismos inmunológicos e inflamatorios en los pacientes con el fenotipo de asma asociado a la obesidad no son mediados por la clásica respuesta alérgica Th2, sino por una respuesta inmune Th1; sin embargo, en su estudio no se encontraron hallazgos en donde la respuesta inmunológica Th17 tenga un papel biológico en el asma asociado a la obesidad.

Aunque el estudio de Rastogi et al. [104] no reportó que el perfil de metilación en los promotores de los genes que participan en la vía de la diferenciación del linfocito Th17 fuera importante en el asma con obesidad, su estudio muestra datos interesantes; los adolescentes con asma y obesidad tienen una disminución en el perfil de metilación en el promotor del gen *ADAM17* en comparación con los adolescentes sanos y con asma sin obesidad.

ADAM17 es una enzima pro-inflamatoria que causa ectodominios en la IL-6 y en TNF- α ; dado que la IL-6 es esencial para la diferenciación del linfocito Th17 y que el TNF- α estimula recíprocamente a la IL-17A [104]; podríamos asumir que en los adolescentes con asma y obesidad los promotores de *IL17A* y *RORC* quienes actúan en conjunto con la IL-6 para la diferenciación del linfocito Th17 podrían tener disminuido su perfil de metilación.

Una limitación del estudio de Rastogi et al. [104] es que no describe las características inmunológicas de los pacientes con asma, no sabemos si los pacientes con asma y obesidad son exclusivamente no-alérgicos y si los pacientes con asma sin obesidad son exclusivamente alérgicos, además no especifica la temporalidad; si la obesidad precedió al diagnóstico de asma. Asimismo, la técnica utilizada en ese estudio epigenome-wide methylation assay; por su nombre en inglés, mide la metilación de 2 millones de loci en un solo ensayo; no obstante, no permite medir específicamente la metilación en el promotor de un solo gen.

Recientemente, Jeong et al. [105] en un estudio de casos y controles anidado en una cohorte (Swiss Cohort Study on Air Pollution and Lung and Heart Diseases in Adults (SAPALDIA)) estudio la metilación de los promotores de los genes de las 17 vías inflamatorias más importantes del fenotipo del asma no-alérgica asociado a la obesidad en el que están contenidos 1027 genes y 15,985 sitios CpG, selecciono a 61 pacientes adultos con asma no-alérgica y obesidad como casos y 146 adultos sanos como controles.

En el metiloma completo de los 1027 genes y 15,985 sitios CpG se encontró una diferencia global en el patrón de metilación entre los grupos ($p=0.04$), pero al momento de hacer el

análisis estratificado de cada vía inflamatoria, por ejemplo en la superfamilia de TNF- α constituida por 38 genes (*TNFRSF4*, *TNFRSF14*, *TNFRSF25*, *TNFRSF9*, *TNFRSF1B*, *TNFSF18*, *TNFSF4*, *TRAF5*, *TRAF6*, *TNFRSF1A*, *LTBR*, *TNFRSF7*, *TNFRSF19*, *TNFSF11*, *TNFSF13B*, *TRAF3*, *TNFRSF12A*, *TNFRSF17*, *TRADD*, *TNFSF12*, *TNFRSF13B*, *TNFRSF11A*, *TNFSF9*, *TNFSF7*, *TNFSF14*, *TNFAIP6*, *TNFRSF13C*, *PTX3*, *TNIP1*, *TTRAP*, *LTA*, ***TNFA***, *TNFAIP3*, *TNFRSF11B*, *TNFSF15*, *TNFSF8*, *TRAF1* and *TRAF2*) y 537 sitios CpG, no se encontró una diferencia en el patrón de metilación ($p=0.08$).

Aunque en la vía de la superfamilia de TNF- α no hubo diferencias entre los grupos, no sabemos si específicamente el promotor del gen de *TNFA* se encuentra hipometilado en el grupo de asma no-alérgica con obesidad.

En contraste, en la vía inflamatoria del eje NLRP3-IL1B-IL17 compuesto por 11 genes (*NLRP3*, *PYCARD*, *CASP1*, *IL1B*, *IL1R1*, ***RORC***, *CCR6*, *ATXN1*, *THY1*, *CD44*, ***IL17A***) y 219 sitios CpG, el perfil metilación es menor en los adultos que durante el seguimiento de 10 años incrementaron su IMC y desarrollaron asma no-alérgica versus los adultos sanos ($p=0.04$).

Aunque en esta vía inflamatoria del eje NLRP3-IL1B-IL17 se encuentran los promotores de los genes *RORC* e *IL17A*, no tenemos el conocimiento como es el perfil de metilación en el promotor de cada gen individualmente.

El estudio de Jeong et al. [105] apoya más nuestra hipótesis, pero la técnica que se utilizó en el estudio como la HumanMethylation450 BeadChip array [106]; por su nombre en inglés, mide la metilación en diferentes regiones del genoma y no específicamente para el promotor de un único gen. Es interesante mencionar que en este el estudio de Jeong et al. [105] tiene una fortaleza muy importante en la selección adecuada de los pacientes, fue el primer estudio en humanos en donde se demostró la temporalidad de los hechos; los adultos seguidos durante 10 años quienes aumentaron su IMC y que posteriormente desarrollaron asma no-alérgica se encontró incrementada la vía inflamatoria NLRP3-IL1B-IL17, en donde se encuentra los genes de *RORC* e *IL17A* que son fundamentales para la diferenciación y activación de los linfocitos Th17, y que además toda la vía se encuentra con menor metilación comparado con adultos sanos, una limitación del estudio de Jeong et al. [105] fue que el perfil metilación de los adultos con asma no-alérgica y obesidad no se comparó con un grupo que solo padeciera obesidad sin asma y otro grupo de asma alérgica sin obesidad.

Más recientemente en un estudio de casos y controles anidado en una cohorte de agricultores en Estados Unidos de Norteamérica (Agricultural Lung Health Study (ALHS)), Hoang et al. [107] estudio a un grupo de adultos con asma no-alérgica (n=673), un grupo con asma alérgica (n=271) y a un grupo de adultos sanos (n=1157).

Con una técnica de metilación masiva de nueva generación la MethylationEPIC BeadChip, Hoang et al. [107] demostró que el 98.5% de los sitios CpG (516 CpG /524 CpG) del grupo de los adultos con asma no-alérgica se encontraban con menor metilación en comparación con los adultos sanos ($p < 0.05$). De manera similar al estudio de Jeong et al. uno de los sitios CpG estudiados fue localizado en el gen de *IL17RA*, sin embargo, esta técnica de metilación masiva no permite medir la metilación de manera específica en el promotor de *IL17RA*.

Respecto al grupo de asma alérgica, este estudio reportó que había 1086 sitios CpG con una metilación diferente en comparación con el grupo de los adultos sanos ($p < 9 \times 10^{-8}$), y que el 99.5% de estos sitios CpG se encontraban con menor metilación, sin embargo, no se documentó que esta diferencia en el grado de metilación de estos sitios CpG se encontraran localizados específicamente en los promotores de los genes de *TNFA*, *IL17A* y *RORC*.

Una de las limitaciones del estudio de Hoang et al. [107] fue la selección de los pacientes, describe a los pacientes con asma no-alérgica, pero no menciona si padecen obesidad, sin embargo una observación que es valiosa mencionar es que la mediana del IMC de los pacientes con asma no-alérgica es de 30.5 kg/m² (rango intercuartil [RIQ]: 26.9–35.1) versus los adultos sanos 28.8 kg/m² (RIQ: 25.6–32.6) y con asma alérgica 29.6 kg/m² (RIQ: 26.1–33.9) lo que sugiere que la mayoría de los pacientes con asma no-alérgica padecían de sobrepeso y obesidad, y por lo tanto aunque no está claro la temporalidad de los hechos, si la obesidad precedió al diagnóstico de asma, posiblemente muchos de ellos sean del fenotipo asmático no tipo-2 descrito por Holguin et al. [20].

Si bien el 98.5% de los sitios CpG en el asma no-alérgica se encontraba con menor metilación en comparación con los adultos sanos, no se realizó en ese estudio una comparación del perfil de metilación con el grupo de asma no-alérgica versus el de asma alérgica, y asma no-alérgica versus un grupo de obesidad sin asma.

Una de las fortalezas de ese estudio fue la adecuada clasificación inmunológica del asma; en asma alérgica y no-alérgica por medio de la medición de IgE específica en suero por la

técnica ImmuneTech (Foster City, CA, USA) usando la plataforma de Luminex (Luminex Corp., Austin, TX, USA) para los aéreo-alergenos más comunes de la región como pólenes de pastos; *Bermuda*, *Timothy*, pólenes de árboles; cedro de las montañas, pólenes de malezas; *Ambrosia*, esporas de hongos; *Alternaria*, aéreo-alergenos intradomiciliarios; *Dermatophagoides sp*, epitelio de perro y gato, y alimentos; leche de vaca, huevo y trigo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Está bien estudiado que hay una asociación entre la obesidad y un fenotipo único de asma no-alérgica, sin embargo, los mecanismos inmunológicos aun no son bien conocidos. [21-26]

Se han realizado varios estudios tanto en niños/adolescentes como en adultos sobre los mecanismos inmunológicos y la dinámica de las citocinas en el modelo del asma con obesidad [21], sin embargo en la mayoría de los estudios no contesta nuestra pregunta de investigación, porque no especifica con claridad a que fenotipo pertenecen; si es el fenotipo asmático no-tipo 2 o si es el fenotipo asmático tipo 2, tampoco mencionan la temporalidad de los hechos; si la obesidad antecede al asma, asimismo solo el estudio de Días et al. [68] especifica detalladamente si se realizaron pruebas alérgicas para clasificar correctamente al fenotipo.

Está bien estudiado que el perfil inmunológico del asma alérgica es mediado por los linfocitos Th2, asimismo, hasta el momento actual no se ha explorado detalladamente si en el fenotipo asmático no-tipo 2 predomina el perfil inmunológico del macrófago M1 (TNF- α) y el perfil del linfocito Th17 (IL-17A, con su factor de transcripción RORC).

Llama la atención que los niños/adolescentes con obesidad seguidos en las cohortes unos desarrollan asma y otros no, que características biológicas tienen los niños/adolescentes con obesidad que desarrollaron asma no-alérgica que los hacen diferentes al resto de los adolescentes con obesidad, es posible que ciertos mecanismos epigenéticos como la alteración en el patrón de metilación en los promotores de los genes de *TNFA*, *RORC* e *IL17A* podrían formar parte de la plausibilidad biológica del fenotipo asmático no-tipo 2.

Respecto al patrón de metilación en los pacientes con asma alérgica, varios autores [97-102] han demostrado que un bajo perfil de metilación en los promotores de los genes de *IL-4*, *IL-4R*, *IL-5R*, *IL-13*, *STAT6* y *GATA3* se ha asociado con asma alérgica con una respuesta inmunológica Th2, pero no tenemos el conocimiento si podría suceder lo mismo en los pacientes con el fenotipo del asma no-alérgica asociada a la obesidad específicamente en los promotores de los genes de *IL17A*, *RORC* en los linfocitos Th17 y en las ILC3, y en el promotor del gen de *TNFA* en el macrófago M1.

El estudio de Jeong et al. [105] es similar a nuestro estudio, sin embargo no contesta nuestra pregunta de investigación; en primer lugar porque el perfil de metilación fue

realizado en regiones de varios genes y no específicamente en los promotores de los genes de *TNFA*, *IL17A* y *RORC*; y en segundo lugar porque el patrón de metilación cambia con la edad y el estadio puberal [108]; si bien el estudio de Jeong et al. [105] fue realizado en adultos, no sabemos cómo se podría comportar el perfil de metilación en niños/adolescentes con el fenotipo asmático no-tipo 2. Por lo que en base a la información obtenida en la literatura nos hemos formulado la siguiente pregunta de investigación.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la diferencia en las concentraciones séricas de TNF- α e IL-17A, las expresiones génicas y el grado de metilación en los promotores de los genes de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* en leucocitos de sangre periférica entre los grupos de adolescentes sanos, con asma alérgica sin obesidad, obesidad sin asma y asma no-alérgica con obesidad?

HIPÓTESIS

Las concentraciones séricas de TNF- α e IL-17A y las expresiones génicas de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* serán mayores y el grado de metilación en los promotores de los genes de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* será menor en el grupo de adolescentes con asma no-alérgica con obesidad en comparación con los grupos adolescentes sanos, con asma alérgica sin obesidad y obesidad sin asma.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la diferencia en las concentraciones séricas de TNF- α e IL-17A, las expresiones génicas y el grado de metilación en los promotores de los genes de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* en leucocitos de sangre periférica entre los grupos de adolescentes sanos, con asma alérgica sin obesidad, obesidad sin asma y asma no-alérgica con obesidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la asociación de las concentraciones séricas de TNF- α e IL-17A con las expresiones génicas de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* en los cuatro grupos de adolescentes.

Evaluar la asociación en el grado de metilación de los promotores de los genes de *TNFA*, *RORC* e *IL17A* con sus expresiones génicas en los cuatro grupos de adolescentes.

Evaluar la asociación del grado de metilación de los promotores de los genes de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* con las concentraciones séricas TNF- α e IL-17A en los cuatro grupos de adolescentes.

JUSTIFICACIÓN

La obesidad y el sobrepeso es un grave problema de salud pública en México, de acuerdo con la encuesta nacional de salud y nutrición 2018, el 38.4% de nuestros adolescentes entre 12 a 19 años padecen sobrepeso y obesidad, y hasta el momento actual no se ha demostrado ninguna estrategia eficaz para disminuir su prevalencia [109].

Estudios en niños y adolescentes con asma y obesidad han demostrado que tienen mayor riesgo de crisis asmática grave, menor calidad de vida, peor control de los síntomas, mayor número de visitas a urgencias, uso de ventilación mecánica, resistencia a los esteroides inhalados, mayores costos económicos en una hospitalización, y un mayor número de días de estancia hospitalaria en comparación con los niños y adolescentes con asma sin obesidad [110].

La etiología multifactorial del fenotipo asmático no-tipo 2 es una limitación importante para el tratamiento y el control de la enfermedad en este grupo de pacientes [111-113]. El conocer de una manera más específica las citocinas más importantes de la inflamación sistémica de bajo grado de la obesidad y de las que causan un daño pulmonar en el asma como el TNF- α y la IL-17A nos permitirá clasificar mejor el fenotipo asmático en los adolescentes y por lo tanto podríamos individualizar y ofrecer un mejor tratamiento.

Las alteraciones epigenéticas permitirán aportar conocimientos en el entendimiento de la plausibilidad biológica del fenotipo del asma asociado a la obesidad, en este caso, el grado de metilación de los promotores de los genes de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* podría aportar una posible explicación del porqué los adolescentes con obesidad quienes durante el transcurso del tiempo desarrollan el asma no-alérgica presentan mayores concentraciones séricas de TNF- α e IL-17A y en consecuencia la enfermedad.

METODOLOGÍA

Diseño del estudio.

Por imposición de la maniobra: Observacional.

Por diseño metodológico: Transversal comparativo

Por el número de mediciones: Transversal

Por el tiempo y la recolección de datos: Prospectivo y prolectivo.

Por objetivo: Asociación / Explicativo

Universo de estudio.

Estudio transversal comparativo en cuatro grupos de adolescentes:

1. Adolescentes sanos.
2. Adolescentes con asma alérgica sin obesidad.
3. Adolescentes con obesidad sin asma.
4. Adolescentes con asma no-alérgica con obesidad.

De 11 a 18 años de la consulta externa de la clínica de obesidad y del servicio de alergia e inmunología clínica pediátrica del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Muestreo: No probabilístico por conveniencia.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión.

Criterios de inclusión de adolescentes con asma no-alérgica con obesidad.

1. Adolescentes de 11 a 18 años.
2. Obesidad de origen exógeno con un IMC \geq percentil 95% de los valores de referencia para edad y género de las gráficas del Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés) [114].
3. El diagnóstico de obesidad debe de preceder al diagnóstico de asma.

4. Diagnóstico de asma realizado por un médico en base a la historia clínica, exploración física y los criterios clínicos de GINA 2018 [4] (Global Initiative For Asthma por su nombre y siglas en inglés).
5. Asma con una evolución de \geq de 6 meses.
6. Asma no alérgica (pruebas cutáneas negativas).
7. Diagnóstico de asma confirmado por una espirometría de por lo menos de 12 meses previos a la visita 1, con reversibilidad al β dos inhalado \geq 12% o 200 ml en el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF1) respecto a su valor basal.
8. Con la gravedad del asma como leve intermitente, leve persistente y moderada persistente de acuerdo con el National Asthma Education and Prevention Program (NAEPP) (Expert Panel Report 3) [115].

Criterios de inclusión de adolescentes con obesidad sin asma.

1. Adolescentes de 11 a 18 años.
2. Obesidad de origen exógeno con un IMC \geq percentil 95% de los valores de referencia para edad y género de las gráficas del Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés) [114].

Criterios de inclusión de adolescentes con asma alérgica sin obesidad.

1. Adolescentes de 11 a 18 años.
2. Diagnóstico de asma realizado por un médico en base a la historia clínica, exploración física y los criterios clínicos de GINA 2018 [4] (Global Initiative For Asthma por su nombre y siglas en inglés).
3. Asma con una evolución de \geq de 6 meses.
4. Asma alérgica (pruebas cutáneas positivas por lo menos a un aeroalérgeno).
5. Diagnóstico de asma confirmado por una espirometría de por lo menos de 12 meses previos a la visita 1, con reversibilidad al β dos inhalado \geq 12% o 200 ml en el VEF1 respecto a su valor basal.

6. IMC normal (IMC entre el 10 al 85% percentil de acuerdo con las gráficas del Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés) [114].
7. Con la gravedad del asma como leve intermitente, leve persistente y moderada persistente de acuerdo con el National Asthma Education and Prevention Program (NAEPP) (Expert Panel Report 3) [115].

Criterios de inclusión de adolescentes sanos.

1. Adolescentes sanos de 11 a 18 años
2. IMC normal (IMC entre el 10 al 85% percentil de acuerdo con las gráficas del Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés) [114].

Criterios de exclusión.

Criterios de exclusión para los adolescentes con asma no-alérgica con obesidad.

1. Tratamiento con inmunomoduladores e inmunoestimulantes previo a los 6 meses de iniciar el estudio.

Criterios de exclusión para los adolescentes con asma alérgica sin obesidad.

1. Pacientes que estén recibiendo inmunoterapia específica para alérgenos.
2. Tratamiento con inmunomoduladores e inmunoestimulantes previo a los 6 meses de iniciar el estudio.

Criterios de exclusión para los cuatro grupos de adolescentes.

1. Enfermedades sistémicas y crónico degenerativas (pulmonares, renales, cardiovasculares, infecciosas, inmunológicas, gastroenterológicas, musculares, endocrinopatías, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial, esteatosis hepática no alcohólica y cáncer).
2. Tratamiento con esteroide sistémico en ciclo cortó o continuo tres meses previos al reclutamiento.
3. Tabaquismo activo y/o pasivo.

Criterios de eliminación.

1. Padres o tutores o pacientes que decidan retirarse del estudio en cualquier momento.
2. Muestra no adecuada para obtener y procesar adecuadamente el material genético.

DEFINICIONES OPERACIONALES DE LAS VARIABLES

Variables dependientes.

1. Concentraciones séricas de TNF- α

Definición conceptual: El TNF- α es una de las principales citocinas mediadoras en la respuesta inflamatoria e inmune. Esta citocina es producida principalmente por monocitos, macrófagos, linfocitos, tejido adiposo y músculos.

Definición operativa: Concentración de TNF- α en picogramos sobre mililitro (pg/ml) en el suero de los sujetos de investigación.

Método de medición: ELISA ultrasensible.

Categoría: Cuantitativa

Escala de medición: Continúa

Unidad de medición: pg/ml

2. Concentraciones séricas de IL-17A.

Definición conceptual: Es una citocina inflamatoria que ejerce su función principalmente sobre células mieloides y células mesenquimales, consiste en 155 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 35 kDa. Su función inmunológica es la protección en contra de hongos y bacterias extracelulares por medio de la activación de los neutrófilos.

Definición operativa: Concentración de IL-17A en picogramos sobre mililitro (pg/ml) en el suero de los sujetos de investigación.

Método de medición: ELISA ultrasensible.

Categoría: Cuantitativa

Escala de medición: Continúa

Unidad de medición: pg/ml.

3. Expresión génica de *TNFA*, *IL17A* y *RORC*.

Definición conceptual: Es el ácido ribonucleico que transfiere el código genético procedente del ADN del núcleo celular a un ribosoma en el citoplasma, determina el orden

en que se unirán los aminoácidos de una proteína y actúa como plantilla o patrón para la síntesis de dicha proteína.

Definición operativa: Es el ácido ribonucleico de leucocitos de sangre periférica de los sujetos de investigación que transfiere el código genético procedente del ADN del núcleo celular a un ribosoma en el citoplasma, determina el orden en que se unirán los aminoácidos de una proteína y actúa como plantilla o patrón para la síntesis de dicha proteína.

Método de medición: PCR en tiempo real

Categoría: Cuantitativa.

Escala de medición: Continúa.

Unidad de medición: $2^{\Delta\Delta ct}$

4. Metilación de los promotores de los genes de *TNFA*, *IL17A* y *RORC*.

Definición conceptual: Es el mecanismo epigenético de la adición de un grupo metilo (CH₃) procedente de la S-adenosilmetionina por medio de la ADN-metiltransferasa al carbono 5 de la citosina dando como resultado la 5-metilcitosina y S-adenosilhomocisteína. La metilación puede regular directamente la expresión de un gen al inhibir la interacción de los factores de transcripción a los sitios en el dinucleotido CpG (sitio CpG) o facilitar la unión de los factores inhibitorios de transcripción.

Definición operativa: Es la proporción de las citosinas unidas a un grupo metilo (CH₃) en el carbono 5 (5-metilcitosina) del dinucleotido CpG (sitio CpG) en los promotores de los genes de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* en leucocitos de sangre periférica de los sujetos de investigación.

Método de medición: RT-PCR (PCR en tiempo real).

Categoría: Cuantitativa.

Escala de medición: Continúa.

Unidad de medición: Porcentaje (%).

Variables independientes.

1. Asma no-alérgica con obesidad.

Definición conceptual: Pacientes con diagnóstico de obesidad realizado por un médico previo al diagnóstico de asma, caracterizada por síntomas respiratorias como tos, sibilancias, opresión torácica y dificultad respiratoria, que varían en intensidad a lo largo del tiempo, con limitación del flujo de aire, con reversibilidad al β dos inhalado $\geq 12\%$ o 200 ml en el VEF1 respecto a su valor basal por espirometría, el asma no es asociada a alergia, por lo tanto, las pruebas cutáneas (alérgicas) son negativas.

Definición operacional: Pacientes con diagnóstico de obesidad realizado por un médico previo al diagnóstico de asma, caracterizada por síntomas respiratorias como tos, sibilancias, opresión torácica y dificultad respiratoria, que varían en intensidad a lo largo del tiempo, con limitación del flujo de aire, con reversibilidad al β dos inhalado $\geq 12\%$ o 200 ml en el VEF1 respecto a su valor basal por espirometría, el asma no es asociada a alergia, por lo tanto, las pruebas cutáneas (alérgicas) son negativas.

Método de medición: Respecto al asma no-alérgica; por medio de historia clínica y exploración física, reversibilidad postbroncodilatador $\geq 12\%$ o 200ml en VEF1 en la espirometría, con pruebas cutáneas (alérgicas) negativas. Respecto a la obesidad; $IMC = \text{Peso en Kg} / (\text{Talla en metros})^2$ (kg/m^2), IMC igual o superior al percentil 95% de los valores de referencia para edad y género de las gráficas del CDC [114].

Categoría: Cualitativa.

Escala de medición: Nominal dicotómica.

Unidad de medición: a. Con asma no-alérgica con obesidad.

b. Sin asma no-alérgica con obesidad.

2. Asma alérgica sin obesidad.

Definición conceptual: Pacientes con IMC normal para su edad y con síntomas respiratorias como tos, sibilancias, opresión torácica y dificultad respiratoria, que varían en intensidad a lo largo del tiempo, con limitación del flujo de aire, con reversibilidad al β dos inhalado $\geq 12\%$ o 200 ml en el VEF1 respecto a su valor basal por espirometría, el asma es asociada a alergia, por lo tanto, las pruebas cutáneas (alérgicas) son positivas por lo menos a un aeroalérgeno y .

Definición operacional: Pacientes con IMC normal para su edad y síntomas respiratorias como tos, sibilancias, opresión torácica y dificultad respiratoria, que varían en intensidad a lo largo del tiempo, con limitación del flujo de aire, con reversibilidad al β dos inhalado \geq 12% o 200 ml en el VEF1 respecto a su valor basal por espirometría, el asma es asociada a alergia, por lo tanto, las pruebas cutáneas (alérgicas) son positivas por lo menos a un aeroalérgeno.

Método de medición: Respecto al asma alérgica; por medio de la historia clínica y exploración física, reversibilidad postbroncodilatador \geq 12% ó 200ml en VEF1 en la espirometría, con pruebas cutáneas (alérgicas) positivas. Respecto al IMC normal; IMC entre el 10 al 85% percentil de acuerdo con las gráficas del CDC [114].

Categoría: Cualitativa.

Escala de medición: Nominal dicotómica.

Unidad de medición: a. Con asma alérgica sin obesidad.

b. Sin asma alérgica sin obesidad.

3. Obesidad sin asma.

Definición conceptual: De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud la obesidad se define como el cúmulo excesivo de grasa corporal que afecta la salud.¹

Definición operacional: La obesidad en niños y adolescentes se identifica cuando el IMC es igual o superior del percentil 95% de los valores de referencia para edad y género de las gráficas del CDC [114].

Método de medición: $IMC = \text{Peso} / (\text{Talla en metros})^2$ (kg/m²), IMC igual o superior al percentil 95% de los valores de referencia para edad y género de las gráficas del CDC [114].

Categoría: Cualitativa.

Escala de medición: Nominal dicotómica.

Unidad de medición: a. Con obesidad sin asma.

b. Sin obesidad sin asma.

Variables de confusión.

1. Edad.

Definición conceptual: Edad desde el nacimiento al inicio del estudio en años cumplidos.

Definición operacional: Edad desde el nacimiento al inicio del estudio en años cumplidos.

Método de medición: Historia clínica.

Categoría: Cuantitativa

Escala de medición: Discreta.

Unidad de medición: Años.

2. Genero.

Definición conceptual: Características fenotípicas que diferencian al hombre de la mujer.

Definición operacional: Características fenotípicas que diferencian al hombre de la mujer.

Método de medición: Historia clínica y exploración física.

Categoría: Cualitativa.

Escala de medición: Nominal dicotómica.

Unidad de medición: a. Masculino.

b. Femenino.

3. Tiempo de evolución del asma.

Definición conceptual: Tiempo transcurrido en años desde que un médico realizo el diagnostico de asma hasta el ingreso del estudio.

Definición operacional: Tiempo transcurrido en años desde que un médico realizo el diagnostico de asma hasta el ingreso del estudio.

Método de medición: Historia clínica.

Categoría: Cuantitativa

Escala de medición: Discreta.

Unidad de medición: Años.

4. Tiempo de evolución de la obesidad.

Definición conceptual: Tiempo transcurrido en años desde que un médico realizo el diagnostico de obesidad hasta el ingreso del estudio.

Definición operacional: Tiempo transcurrido en años desde que un médico realizo el diagnostico de obesidad hasta el ingreso del estudio.

Método de medición: Historia clínica.

Categoría: Cuantitativa

Escala de medición: Discreta

Unidad de medición: Años

5. Gravedad del asma.

Definición conceptual:

Asma leve intermitente de acuerdo con NAEPP [115]; a) el paciente puede presentar síntomas de asma durante ≤ 2 días/semana, b) puede presentar despertares nocturnos debido a síntomas de asma durante ≤ 2 veces/mes, c) uso de β_2 agonista inhalado para el control de los síntomas ≤ 2 días/semana, d) los síntomas de asma no deben interferir con sus actividades cotidianas, e) $VEF_1 > 80\%$, e) uso de esteroide sistémico para crisis asmáticas 0-1 vez/año.

Asma leve persistente de acuerdo con NAEPP [115]; a) el paciente puede presentar síntomas de asma durante > 2 días/semana, pero no diario, b) puede presentar despertares nocturnos debido a síntomas de asma durante 3-4 veces/mes, c) uso de β_2 agonista inhalado para el control de los síntomas > 2 días/semana, pero no diario y no más de una vez al día, d) los síntomas de asma pueden tener una limitación leve con sus actividades cotidianas, e) $VEF_1 > 80\%$, e) uso de esteroide sistémico para crisis asmáticas ≥ 2 veces/año.

Asma moderada persistente de acuerdo con NAEPP [115]; a) el paciente puede presentar síntomas diariamente, b) puede presentar despertares nocturnos debido a síntomas de asma durante > 1 día/semana, pero no todos los días, c) uso de β_2 agonista inhalado diariamente para el control de los síntomas, d) los síntomas de asma pueden tener una

limitación moderada con sus actividades cotidianas, e) VEF_1 60-80%, e) uso de esteroide sistémico para crisis asmáticas ≥ 2 veces/año.

Definición operacional:

Asma leve intermitente: si el paciente en la evaluación clínica inicial presenta; a) síntomas de asma durante ≤ 2 días/semana, b) despertares nocturnos debido a síntomas de asma durante ≤ 2 veces/mes, c) uso de β_2 agonista inhalado para el control de los síntomas ≤ 2 días/semana, d) los síntomas de asma no deben interferir con sus actividades cotidianas, e) $VEF_1 > 80\%$, e) uso de esteroide sistémico para crisis asmáticas 0-1 vez/año.

Asma leve persistente: si el paciente en la evaluación clínica inicial presenta; a) síntomas de asma durante > 2 días/semana, pero no diario, b) despertares nocturnos debido a síntomas de asma durante 3-4 veces/mes, c) uso de β_2 agonista inhalado para el control de los síntomas > 2 días/semana, pero no diario y no más de una vez al día, d) los síntomas de asma pueden tener una limitación leve con sus actividades cotidianas, e) $VEF_1 > 80\%$, e) uso de esteroide sistémico para crisis asmáticas ≥ 2 veces/año.

Asma moderada persistente: si el paciente en la evaluación clínica inicial presenta; a) síntomas diariamente, b) despertares nocturnos debido a síntomas de asma durante > 1 día/semana, pero no todos los días, c) uso de β_2 agonista inhalado diariamente para el control de los síntomas, d) los síntomas de asma pueden tener una limitación moderada con sus actividades cotidianas, e) VEF_1 60-80%, e) uso de esteroide sistémico para crisis asmáticas ≥ 2 veces/año.

Método de medición: Historia clínica.

Categoría: Cualitativa

Escala de medición: Nominal policotómica

Unidad de medición: a. Asma leve intermitente.

b. Asma leve persistente.

c. Asma moderada persistente.

6. Uso de Esteroide Inhalado.

Definición conceptual: Uso del grupo de medicamentos de esteroides inhalados como fluticasona, beclometasona, ciclesonida, budesonida y mometasona para el control de los síntomas de asma al momento de ingresar al estudio.

Definición operacional: Uso del grupo de medicamentos de esteroides inhalados como fluticasona, beclometasona, ciclesonida, budesonida y mometasona para el control de los síntomas de asma al momento de ingresar al estudio, a dosis equivalentes de 200-400µg/día de budesónida inhalada.

Método de medición: Historia clínica

Categoría: Cualitativa.

Escala de medición: Nominal dicotómica.

Unidad de medición: a. No utiliza.

b. Utiliza esteroide inhalado.

7. Estadio de Tanner.

Definición conceptual: Escala de valoración clínica de la evolución de los caracteres sexuales secundarios.

Definición operacional: Escala de valoración clínica de la evolución de los caracteres sexuales secundarios.

Método de medición: Exploración física y escala de Tanner [116].

Categoría: Cualitativa

Escala de medición: Ordinal.

Unidad de medición: Grados de la escala de Tanner. a) Grado I.

b) Grado II.

c) Grado III.

d) Grado IV.

e) Grado V.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se estimó el tamaño de la muestra en base a una diferencia de medias de las concentraciones séricas de TNF- α e IL-17A de acuerdo con la siguiente formula. $N = 2s^2(Z\beta + Z\alpha)^2/d^2$

Los datos fueron tomados de acuerdo con ambos estudios de Rastogi et al. en niños y en adolescentes como se muestran en la siguiente tabla, con una significancia estadística del 95% ($\alpha=0.05$, bilateral) y con un poder estadístico del 80% ($\beta=0.20$).

Basados en nuestra hipótesis se realizó el siguiente cálculo del tamaño de la muestra como se aprecia en la Tabla 1. Hipótesis: Las concentraciones séricas de TNF- α e IL-17A serán mayores en los adolescentes con asma no-alérgica con obesidad en comparación con los adolescentes sanos, asma alérgica sin obesidad y obesidad sin asma.

Tabla 1. Cálculo de tamaño de la muestra de acuerdo con los estudios de Rastogi et al. en niños y adolescentes.

	Asma con obesidad	Sanos	Delta	Desviación estándar	n
TNF- α	1.31 \pm 0.43	1.01 \pm 0.33	0.31	0.43	26
IL-17A	0.07 \pm 0.78	0.27 \pm 0.93	0.20	0.78	238
	Asma con obesidad	Asma sin obesidad			
TNF- α	0.60 \pm 0.46	0.29 \pm 0.44	0.31	0.46	35
IL-17A	0.07 \pm 0.78	-0.13 \pm 0.70	0.20	0.78	217
	Asma con obesidad	Obesidad sin asma			
TNF- α	1.31 \pm 0.43	1.07 \pm 0.35	0.24	0.43	43
IL-17A	0.07 \pm 0.78	0.26 \pm 0.83	0.19	0.78	264

Al momento de realizar el cálculo del tamaño de la muestra no contamos con los datos de medias y desviación estándar para la expresión génica y el perfil de metilación de los promotores de los genes de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* entre los grupos estudiados. Por lo tanto, el cálculo del tamaño de la muestra solo fue realizado en base a las concentraciones séricas de TNF- α e IL-17A. Debido a la factibilidad del estudio se incluyeron en el grupo de los sanos a 23 adolescentes, en el de asma alérgica sin obesidad a 29 adolescentes, en el de obesidad sin asma a 28 adolescentes y en el grupo de asma no-alérgica con obesidad a 22 adolescentes.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó estadística descriptiva para obtener las medidas de tendencia central y dispersión en variables cuantitativas (media, mediana, desviación estándar (\pm), rango intercuartil (RIQ) e intervalos de confianza del 95% (IC95%))

Para evaluar la distribución normal de las variables cuantitativas se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk, se consideró normalidad un valor de $p \geq 0.05$. Cuando la distribución de los datos fue normal se estimó una diferencia de medias por medio de la prueba de ANOVA de una vía para más de dos grupos y se realizó un análisis de post-hoc de Bonferroni para evaluar una diferencia de medias entre los grupos.

Cuando la distribución de los datos no presento normalidad se utilizó la prueba estadística de U de Mann–Whitney para evaluar la diferencia de medianas en dos grupos y de Kruskal-Wallis para más de dos grupos, se realizó un análisis post-hoc de Dunn para determinar las diferencias de medianas entre los diferentes grupos.

Se utilizó la prueba de Chi-cuadrada para estimar una diferencia de proporciones en las variables cualitativas. Para evaluar la correlación entre dos variables cuantitativas se utilizó la prueba estadística de coeficiente de correlación de Spearman y se consideró una correlación débil $r_s < 0.30$, una correlación moderada $0.3 < r_s < 0.70$ y una correlación fuerte $r_s > 0.70$ [117].

Se realizó un modelo de regresión lineal multivariable para ajustar las variables de confusión, con el objetivo de cumplir con los supuestos en el modelo de regresión multivariable todas las variables cuantitativas fueron transformadas al logaritmo natural con la finalidad de tener datos más robustos y con distribución normal. El perfil de metilación de los promotores de los genes de *RORC*, *IL17A* y *TNFA* no se transformó a logaritmo natural dado que presentó una distribución normal.

Se determinó una diferencia estadísticamente significativa si el valor de $p < 0.05$. Se utilizó el software estadístico STATA® versión 16.0 y GraphPad® Prism software, version 8 (GraphPad Software, La Jolla, Calif).

CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio se apegó a los lineamientos internacionales de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial “Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos” [118] y al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Se obtuvieron 5 ml de sangre con anticoagulante para realizar la determinación de la expresión génica y el perfil de metilación en los promotores de los genes, y 5ml de sangre sin anticoagulante para medir las concentraciones séricas de TNF- α e IL17-A. De acuerdo con el artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud el presente estudio se considera de riesgo mínimo para los participantes.

Los investigadores del presente estudio siempre se aseguraron de llevar a cabo el principio de la **autonomía** revelando siempre la información necesaria contenida en la carta del consentimiento informado, verificando su comprensión de la misma por parte de todos los padres o tutores y los participantes fortaleciendo siempre la **voluntariedad** de estos.

A todos los padres o tutores de los participantes del estudio se les solicitó el consentimiento informado (anexo 1), a todos los participantes se les solicitó el asentimiento informado (anexo 2).

El principio de **no maleficencia** se llevó a cabo respetando la privacidad de todos los participantes, se protegió la confidencialidad de la información y nunca se omitió algún tipo de información respecto a los riesgos y beneficios de los procedimientos del estudio.

El principio de **beneficencia** se llevó a cabo explicando detalladamente los beneficios del estudio. Se llevó a cabo el principio de **justicia** al momento de seleccionar a los participantes, a todos los potenciales candidatos se les realizó la invitación a participar en el estudio sin importar la raza, etnicidad, género y condición socioeconómica.

El protocolo ha sido aprobado por los comités de investigación, ética en investigación y de bioseguridad con el **número de aprobación HIM/2013/015, SSa. 1061.**

CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD

La toma de muestra de sangre se llevó a cabo de acuerdo con los lineamientos propuestos por la norma oficial mexicana **NOM-007-SSA3-2011** para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos y el material será estéril y de uso único.

Para la manipulación tanto del material biológico como de los reactivos que se emplearon durante el desarrollo del proyecto se utilizó de manera permanente elementos de protección personal: bata, guantes y en algunos casos protectores como cubre bocas o lentes, mantenidos en buenas condiciones de higiene. Los desechos generados a partir de las muestras biológicas fueron contenidos dentro de un recipiente rojo, específicamente para fluidos biológicos.

Las puntas para micro-pipetas, tubos, gasas, algodón entre otros instrumentos que estuvieron en contacto con el material biológico se depositaron en un contenedor para desechos sólidos. En el caso de los desechos punzocortantes se colocaron en un solo recipiente rojo destinado para ese fin. Cada contenedor se encontraba debidamente etiquetado. En cuanto a otro tipo de desechos no biológicos empleados para el trabajo de laboratorio se depositaron en un recipiente destinado a este tipo de productos.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Visita 1. Reclutamiento.

El paciente fue captado por la consulta externa del departamento de alergia o de la clínica de obesidad del Hospital Infantil de México Federico Gómez y de escuelas secundarias aledañas a la zona del hospital. El paciente se citó en la oficina de Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica una vez que se corroboran los criterios de inclusión o exclusión.

Una vez que se platicó con los padres o tutores sobre el estudio, los objetivos y los beneficios posibles, se procedió a realizar el proceso y firma del consentimiento y asentimiento informado (anexo 1) (anexo 2).

Se realizó una historia clínica completa (anexo 3), examen físico (EF) y antropometría por un médico especialista en alergia e inmunología clínica pediátrica, toma de signos vitales (frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, presión arterial, temperatura y medición de peso, talla e índice de masa corporal, perímetro abdominal, perímetro de cintura y de cadera).

La altura se midió hasta los 0,5 cm más cercanos utilizando un estadiómetro, y el peso se midió al 0,1 kg más cercano utilizando una báscula clínica (Health Meter® 402 KL, USA).

Los adolescentes se pesarán con ropa ligera y sin zapatos. La circunferencia de la cintura se midió en la línea media entre la última costilla y la cresta ilíaca después de una espiración normal y en una posición de pie. El IMC se calculó el peso en kilogramos dividido entre la altura en metros elevado al cuadrado.

Visita 2. Toma de laboratorios.

En la tercera visita se obtuvo 10 ml de sangre venosa en ayuno para los ensayos de laboratorio. Para la cuantificación de las concentraciones séricas de IL-17A y TNF- α se utilizó un tubo vacutainer rojo de 5ml; para la cuantificación de la expresión génica y el grado de metilación de los genes, el ADN y el ARNm se extrajeron de 5 ml sangre venosa del tubo vacutainer morado con anticoagulante.

Se obtendrán muestras sanguíneas venosas en ayuno de 8 horas a las 9:00 am, el cual serán tomadas por médicos especialistas y por químicos farmacobiólogos en el laboratorio de alergia e inmunología clínica pediátrica, posteriormente se trasladarán y se procesarán para el suero, ARNm y ADN en el laboratorio de investigación en farmacología.

Visita 3. Resultados.

La cuarta visita es para dar el conocimiento de la información obtenida de los laboratorios a los padres/tutores y al paciente.

Cronograma del estudio.

Visitas	Visita 1	Visita 2	Visita 3
Margen entre visitas	1-15 días antes de la visita 2	30-60 días antes de la visita 3	± 60 días.
Consentimiento Informado.	x		
Historia Clínica.	x		
Criterios de selección.	x		
Exploración Física.	x		
Toma de muestra de material genético y suero.		x	
Información de los resultados a los padres/tutores y al paciente de los exámenes practicados.			x

RECURSOS HUMANOS E INFRAESTRUCTURA FÍSICA

Los pacientes fueron captados por la consulta externa de la clínica de obesidad y la consulta externa de Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica del Hospital Infantil de México Federico Gomez (HIMFG) y de escuelas secundarias aledañas a la zona del hospital. Dichas unidades cuentan con todo el equipo de infraestructura que apoya la realización de los expedientes.

El servicio de Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica del HIMFG cuenta con alergólogos titulados y certificados por el Consejo Nacional de Inmunología Clínica A.C, quienes realizaran los procedimientos clínicos como; historia clínica, exploración física, antropometría, la selección adecuada de los pacientes, pruebas cutáneas y la toma de los laboratorios. El laboratorio de fisiología pulmonar cuenta con un espirómetro equipado marca Vmax Spectra® 209, Yerba Linda, CA, USA y un técnico capacitado realizar pruebas de función pulmonar.

El trabajo experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Investigación en Farmacología del HIMFG el cual cuenta con la siguiente infraestructura: qPCR (PrimePro48®), PCR punto final (Prime), NanoPhotometer, Synergy 2® (Lector de microplacas para medición de ELISA), centrifugas de mesa refrigerada, espectrofotómetro, cámara de electroforesis, sistema de imagen E-Gel, refrigerador de -70 °C y de -30 °C, baños de incubación, balanza analítica. Además, dicha unidad cuenta con 3 químicos académicos, 3 auxiliares laboratorios y 1 secretaria quienes apoyaron para cumplir con los objetivos de este proyecto.

ENSAYO DE LABORATORIO

Determinación de las concentraciones séricas de TNF- α e IL-17A.

Las concentraciones séricas de TNF- α e IL-17A fueron medidas por medio de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas y nombre en inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) usando el TNF alpha Human ELISA Kit, Ultrasensitive Marca: Thermo Fisher Scientific® y el Human IL-17 Quantikine HS ELISA Kit Marca: R&D Systems® respectivamente.

Determinación de la expresión génica.

Extracción ARNm Total

La sangre total se almacenó en tubos con EDTA para su posterior procesamiento. El ARN se extrajo por el método del Tiocinato de guanidino (Trizol ^{MR}) (Chomczynski, 1993) [119]. Se tomaron 300 μ L de sangre total y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL con 700 μ L de Trizol. El material contenido en el tubo fue agitado en vortex para lisar completamente las células, posteriormente se agregaron 200 μ L de cloroformo, se mezcló por vortex y se deja incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente, una vez transcurrido este tiempo se centrifuga la mezcla a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se pasó a un tubo de 1.5 mL, a continuación se le adicionaron 500 μ L de isopropanol, se mezcló por inversión, se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se centrifugó 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. (se observa un pellet en el fondo del tubo). Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 1000 μ L de etanol al 70% y se mezcla en vortex para resuspender el pellet y se centrifuga 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C (este procedimiento 3 veces para lavar el ARN). Se desecha el sobrenadante y se deja secar el ARN durante 1 hora aproximadamente.

Tratamiento con inhibidor de ARNasas y ADNasas

Una vez obtenido el ARN, se realizó un tratamiento para inhibir ARNasas y eliminar ADN (ADNasas), para evitar la fragmentación y degradación, además de eliminar ADN remanente de nuestras muestras. Se incubaron las muestras con un buffer conformado de: buffer de incubación (1X), ADNasa (1X), inhibidor de ARNasas (1X) en un volumen final de 50 μ L (Thermo, Scientific). A continuación, se incubaron las muestras a 37°C por 20 minutos, posteriormente se detuvieron las reacciones adicionando 400 μ L de Trizol y se volvió a

extraer el ARN por el método aquí mencionado. Finalmente, el ARN se suspendió en 20 µL de agua libre de ARNasas.

Cuantificación e integridad de ARNm total

La cuantificación de ARN total fue realizada en el espectrofotómetro (IMPLENT) colocando 1 µL de muestra, se tomó en cuenta la relación de pureza 260/230 y 260/280 nm la cual se mantuvo entre 1.9+ 0.2 en todas las muestras, el cual fué consistente con la ausencia de contaminación del ARN. Para corroborar la integridad del ARN se realizó una electroforesis en gel de agarosa (2%) a 60 volts durante 30 minutos para identificar la integridad de las subunidades 18s y 28s.

Síntesis de ADNc

Se sintetizó el ADNc a partir de 1 µg ARN mediante la reacción de retrotranscriptasa (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit de Roche) de acuerdo con (Hidalgo-Figueroa et al., 2017) [120].

Amplificación de genes por RT-qPCR (tiempo real)

El cADN resultante se utilizó para la amplificación de los genes target *TNFA* y *RORC*, así como GAPDH (housekeeping). Las secuencias de los primers fueron como se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de los primers usados para la expresión génica de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* por RT-qPCR.

Gen	Secuencia del primer (5´-3´)	GenBank accession
<i>TNFA</i>	S: CTATCTGGGAGGGGTCTTCC	NM_000594.4
	AS: GGTTGAGGGTGTCTGAAGGA	
<i>RORC</i>	S: AGTCGGAGGGCAAGATCAGA	NM_001001523.2
	AS: CAAGAGAGGTCCTGGGCAAG	
<i>IL17A</i>	S: ACCATTCCCAAAGGTCCTC	NM_002190.3
	AS: GGGGACAGAGTTCATGTGGT	
<i>GAPDH</i>	S: CGACAACCTTTGTCAAGCTCA	NM_001256799.3
	AS: AGGGGTCTACATGGCACCTG	

S: sentido, AS: antisentido.

La mezcla de reacción de PCR en Tiempo Real se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 10 μ l de la siguiente manera: 5 μ l del FastStart SYBR Master (Roche), [300 nM] de primer sentido, [300 nM] μ l del primer antisentido, 1 μ L de cADN, el volumen final se ajustó a 10 μ L con con H₂O grado PCR libre de ARNsas y ADNasas . Las mediciones específicas del ARN mensajero fueron realizadas en el sistema Prime Pro 48 Real-Time PCR (TECHNE).. El RT-qPCR se condujo empleando las siguientes condiciones de ciclos: preincubación de la enzima 10 min a 95°C, desnaturalización a 95°C por 10 seg, alineamiento a 60 °C por 15 seg, amplificación a 72°C por 10 seg. Ciclos totales 40. El threshold (Ct) fue medido en duplicado por cada muestra. Al final de la amplificación se realizó un análisis mediante una curva melting para corroborar la amplificación de productos específicos de la siguiente manera: desnaturalización a 95°C con una rampa de 0.1°C de decremento de temperatura por seg. Los valores de Δ Ct fueron calculados para cada gen en cuestión de la manera siguiente: Ct de interés-Ct de referencia (housekeeping). Los cambios relativos en la expresión de cada gen específico ($\Delta\Delta$ Ct) fueron calculados como Δ Ct de la muestra menos la Δ Ct de referencia y presentados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de acuerdo a (Giacoman-Martínez et al., 2019) [121].

Determinación del porcentaje de metilación del ADN.

Diseño de Cebadores (*Primers*)

Para el diseño de primers se realizó la búsqueda de las secuencias promotoras que regulan cada gen (***RORC*** e ***IL17A***) en la plataforma NCBI (National Center for Biotechnology Information) en donde se analizó al menos 2.5 kb de secuencias corriente arriba de los genes mencionados. A continuación, mediante el software MethPrimer® (Li LC, Dahiya R, 2002) se buscaron regiones o “islas” CpG (considerándose regiones con 50% o más de CpG’s). Las regiones seleccionadas para el diseño de los primers, fueron las regiones proximales al gen, en donde se considera la región más importante para la regulación de la expresión génica. Posteriormente, estas secuencias se utilizaron para el diseño de los primers. A través de la plataforma MethPrimer®, se diseñaron los primers para secuencias metiladas y no metiladas (Tabla 3), considerando que los primers fueran complementarias de regiones CpG’s. Para el caso de la selección de los primers de la región promotora de *TNFA* se utilizaron los empleados en el estudio de Cordero et al. [122].

Aislamiento de ADN

El ADN de las muestras se aisló con el kit Master Pure™ (Epicentre®), de acuerdo a las instrucciones del protocolo del proveedor.

Transformación del ADN con bisulfito

El fundamento de la técnica se basa en convertir citocinas de CpG's no metiladas en uracilos, sin afectar a citocinas de CpG's metiladas. Se utilizó la tecnología EpiTect® Fast DNA Bisulfite kit. 4 µg de ADN por cada muestra se colocaron de manera individual en tubos de 200 µL a las que se les adicionó 80 µL de mezcla de bisulfito y 35 µL de buffer de protección de ADN, se ajustó con agua libre de DNAsas a 140 µL y se homogenizó. A continuación, se llevó a cabo la conversión con bisulfito en un termociclador, con las siguientes condiciones de temperatura secuenciales: 5 min a 95°C (desnaturalización), 25 min a 60°C (Incubación), 5 min a 95°C (desnaturalización), 85 min a 60 °C (incubación), 5 min a 95°C (desnaturalización), 175 min a 60°C (incubación) y finalmente a 20°C. Posteriormente, se centrifugaron las reacciones a 1000 g por 15 segundos posteriormente se transfirió cada muestra a tubos de 1.5 mL. Después, se adiciono 560 µL de buffer BL (Carrier de ARN, y se mezcló con vortex y se centrifugo a 1000 g por 2 min. Posteriormente, se pasó por la columna, se centrifugo a 14000 g por 1 min y se descarto el filtrado, posteriormente, se adicionó 500 µL buffer de lavado a la columna y se centrifugo a 14000 g por 1 min y se descartó el filtrado (el lavado se realizó 2 veces consecutivas). Se incubaron los tubos a 56 °C por 5 min. Se colocó la columna en un tubo de 1.5 mL y se adiciono 20 µL de buffer EB en cada membrana de la columna y se centrifugo a 15000 g por 1 min. Finalmente, el ADN recuperado y convertido se almacenó a -20°C para los siguientes experimentos.

PCR en tiempo real

El ADN convertido se utilizó como templado para evaluar la metilación de las secuencias promotoras. Se utilizó la tecnología FastStart SYBR™Green Master, bajo las siguientes condiciones secuenciales: 95°C por 10 minutos seguida de 40 ciclos de: 94°C por 10 segundos, 57°C o 58°C (dependiendo cada juego de primers, Tabla 3) por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. De manera complementaria, se realizó una curva melting para asegurar no amplificar productos inespecíficos.

El porcentaje de metilación se obtuvo mediante la siguiente formula; metilación = [primer no-metilado / (primer no-metilado + primer metilado)] * 100

Tabla 3. Secuencia de los primers metilados y no metilados usados para la medición del perfil de metilación en los promotores de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* por RT-qPCR.

Gen	Secuencia del primer (5´-3´)	Temperatura (ciclos)
<i>TNFA</i>	(M) S: TTAGAAGATTTTTTTTCGGAATC	57°C (40)
	(M) AS: TATCTCGATTTCTTCTCCATCG	57°C (40)
<i>TNFA</i>	(NM) GGTTTAGAAGATTTTTTTTGGGAATT	57°C (40)
	(NM) TCTATCTCAATTTCTTCTCCATCAC	57°C (40)
<i>RORC</i>	(M) S: TTTAATAAGGGGATTGGGTACG	58°C (40)
	(M) AS: GTCCTTTCAAACAAAACGATA	58°C (40)
<i>RORC</i>	(NM) TTAATAAGGGGATTGGGTATGTG	58°C (40)
	(NM) CATCCTTTCAAACAAAACAATA	58°C (40)
<i>IL17A</i>	(M) S: TGGGAGGTAAAGTGTCGTTA	58°C (40)
	(M)AS: AAACAATATAAAAACTCCCTACGCA	58°C (40)
<i>IL17A</i>	(NM) GTGATTTGGGAGGTAAAGTGTT	58°C (40)
	(NM) ACAATATAAAAACTCCCTACACAA	58°C (40)

M: metilado, NM: no metilado, S: sentido, AS: antisentido.

RESULTADOS

Características clínicas en los cuatro grupos de adolescentes.

Se estudiaron a 102 adolescentes divididos en cuatro grupos de acuerdo su IMC y su condición respiratoria; 1) adolescentes sanos (n=23), 2) asma alérgica sin obesidad (n=29), 3) obesidad sin asma (n=28) y 4) asma no-alérgica con obesidad (n=22). Como se puede apreciar en la Tabla 4 la edad no demostró ser diferente entre los cuatro grupos ($p=0.2$). La proporción del sexo femenino/masculino fue semejante entre los grupos ($p=0.9$), así como la proporción del estadio de Tanner II/III/IV/V ($p=0.8$).

Respecto a las medidas antropométricas no se demostró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de adolescentes sanos versus los adolescentes con asma alérgica sin obesidad, y entre los grupos de adolescentes con obesidad sin asma y asma no-alérgica con obesidad, específicamente en estos dos grupos de adolescentes con obesidad sus medidas antropométricas fueron muy similares (Tabla 4).

Como era de esperarse en los grupos de adolescentes con obesidad sin asma y asma no-alérgica con obesidad las medidas antropométricas como peso, IMC, IMC percentil %, IMC z-score, circunferencia abdominal, de cadera y cintura fueron significativamente superiores comparado con los grupos de adolescentes sanos y asma alérgica sin obesidad (Tabla 4).

El tiempo de evolución de la obesidad fue mayor en el grupo de adolescentes con asma no-alérgica con obesidad comparado con el grupo de obesidad sin asma (9.0 años (RIQ: 7.0-13.0) vs 5.0 años (RIQ: 5.0-5.0), $p < 0.001$, respectivamente) (Tabla 4).

Respecto a las características clínicas del asma la proporción de adolescentes con asma controlada en el grupo de asma alérgica sin obesidad y asma no-alérgica con obesidad fueron considerablemente similares (51.7% vs 50.0%, $p=0.9$, respectivamente). En relación con la gravedad de la enfermedad, la gran mayoría de los adolescentes con asma alérgica sin obesidad y asma no-alérgica con obesidad se clasificaron como asma leve persistente (61.2% vs 54.5%, $p=0.08$, respectivamente). La proporción de adolescentes que utilizaron esteroide inhalado y antileucotrienos al momento del reclutamiento fue muy similar en ambos grupos asmáticos (52.0% vs. 54.5%, $p=0.8$, respectivamente), asimismo el tiempo de evolución del asma fue similar en ambos grupos (6.0 años (RIQ: 5.0-8.0) vs 5.0 años (RIQ: 5.0-6.0), $p=0.1$, respectivamente) (Tabla 4).

Tabla 4. Características clínicas en los cuatro grupos de adolescentes.

	AS (n=23)	AA (n=29)	OB (n=28)	ANA (n = 22)	p
Edad, años	16.0 (13.0-18.0)	13.0 (12.0-17.0)	14.0 (13.0-17.7)	14.0 (11.0-17.0)	0.2
Femenino, n (%)	12 (52.2%)	17 (58.6%)	17 (60.7%)	11 (50.0%)	0.9*
Tanner, n II/III/IV/V	1/6/6/10	3/11/7/8	4/6/10/8	4/7/5/6	0.8*
Peso, kg	54.0 (45.0-58.5)	48.0 (41.6-57.3)	74.8 (70.3-84.9) &#	71.4 (64.0-81.1) &#	< 0.001
Talla, cm	160.0 (154.0-165.0)	155.0 (147.5-164.5)	159.1 (155.0-162.0)	159.1 (152.7-165.5)	0.5
IMC, kg/m ²	21.0 (17.8-23.4)	20.1 (18.5-21.1)	30.5 (28.0-32.3) &#	27.9 (26.7- 31.2) &#	< 0.001
IMC Percentil, %	52.0 (43.0-65.0)	70.0 (41.0-76.5)	97.0 (96.0-98.8) &#	97.0 (96.0-98.1) &#	< 0.001
IMC z-score	0.2 (0.0-0.3)	0.4 (-0.2-0.8)	1.8 (1.7-2.0) &#	1.8 (1.7-2.1) &#	< 0.001
C. Abdominal, cm	76.0 (70.4-83.0)	74.0 (69.4-80.0)	98.0 (93.3-102.7) &#	96.5 (90.4-99.9) &#	< 0.001
C. de cintura, cm	74.2 (67.0-81.8)	72.0 (65.5-79.0)	92.4 (89.6-98.8) &#	90.5 (84.5-96.8) &#	< 0.001
C. de cadera, cm	85.5 (78.3-90.8)	82.0 (79.3-89.8)	103.0 (99.9-109.1) &#	101.0 (94.7-108.6) &#	< 0.001
Tiempo de obesidad, (años)			5.0 (5.0-5.0)	9 (7.0-10.3)	<0.001¶
Tiempo de asma, (años)		6.0 (5.0-8.0)		5.0 (5.0-6.0)	0.1 ¶
Control del asma					0.9*
Controlada (n, %)		15 (51.7%)		11 (50.0%)	
Parcialmente controlada (n, %)		14 (48.3%)		11 (50.0%)	
Gravedad del asma					0.08*
Leve intermitente (n,%)		6 (20.7%)		1 (4.5%)	
Leve persistente (n,%)		18 (62.1%)		12 (54.5%)	
Moderada persistente (n,%)		5 (17.2%)		9 (40.9%)	
Esteroides inhalados (n,%) \$		15 (52.0%)		12 (54.5%)	0.8*
Antileucotrieno (n,%)		5 (17.2%)		7 (31.8%)	0.2*

*Chi-cuadrada de Pearson, ¶ U de Mann-Whitney. Los valores son expresados en medianas y rango intercuartil (RIQ). Abreviaturas: IMC, índice de masa corporal; C, circunferencia; AS, adolescentes sanos; AA, asma alérgica sin obesidad; OB, obesidad sin asma; ANA, asma no-alérgica con obesidad.

& p<0.001 vs AS; # p<0.001 vs AA

\$ Dosis equivalente a 200-400 µcg de budesonida.

Concentraciones séricas de TNF- α y expresión génica de *TNFA*.

Respecto a las concentraciones séricas de TNF- α , el análisis no ajustado demostró que el grupo de asma no-alérgica con obesidad presenta mayores concentraciones de TNF- α en comparación con el grupo de obesidad sin asma (4.6 pg/ml (RIQ: 3.5-7.3) vs 3.1 pg/ml (RIQ: 2.5 -4.3), $p=0.02$, respectivamente), no se observó que el grupo de asma no-alérgica con obesidad (4.6 pg/ml (RIQ: 3.5-7.3) presentara mayores concentraciones de TNF- α versus el grupo de los adolescentes sanos (3.8 pg/ml (RIQ: 2.8-4.3), $p=0.3$) y asma alérgica sin obesidad (3.7 pg/ml (RIQ: 2.9-4.8), $p=0.4$) (Figura 10A).

Sin embargo, en los modelos multivariados, las concentraciones de TNF- α fueron superiores en el grupo de asma no-alérgica con obesidad en comparación con el grupo de los sanos ($\beta=-0.4$, IC95% (-0.7, -0.2) $p=0.02$), asma alérgica sin obesidad ($\beta=-0.3$, IC95% (-0.5, -0.03), $p=0.03$) y obesidad sin asma ($\beta=-0.5$, IC95% (-0.7, -0.2), $p<0.001$) (Tabla 5 - Tabla 7). Las concentraciones de TNF- α fueron superiores en los adolescentes en estadio de Tanner II en comparación con los adolescentes en estadio de Tanner III ($\beta=-0.5$, IC95% (-0.9, -0.06), $p=0.02$) y Tanner IV ($\beta=-0.6$, IC95% (-1.1, -0.02), $p=0.04$) (Tabla 7).

La expresión génica de *TNFA* fue mayor en el grupo de asma no-alérgica con obesidad (2.1 (RIQ: 1.3-2.8)) en comparación con el grupo de los adolescentes sanos (0.9 (RIQ: 0.7-1.3), $p<0.001$) y el grupo de obesidad sin asma (1.0 (RIQ: 0.8-1.4), $p=0.003$) (Figura 10B). No se demostró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de asma no-alérgica con obesidad versus asma alérgica sin obesidad en el análisis no ajustado (2.1 (RIQ: 1.3-2.8) vs 1.3 (RIQ: 1.1-2.2), $p=1.0$, respectivamente) y en los modelos de regresión lineal multivariable (Tabla 5 - Tabla 7).

El resto de las variables de confusión incluidas en los modelos multivariados como el sexo, edad, tiempo de evolución de la obesidad, gravedad del asma, el uso de esteroide inhalado y el tiempo de evolución del asma no demostraron ser predictoras para las concentraciones séricas de TNF- α y la expresión génica de *TNFA* (Tabla 5 – Tabla 7).

Figura 10. Concentraciones séricas de TNF- α y expresión génica de *TNFA* en los cuatro grupos de adolescentes.

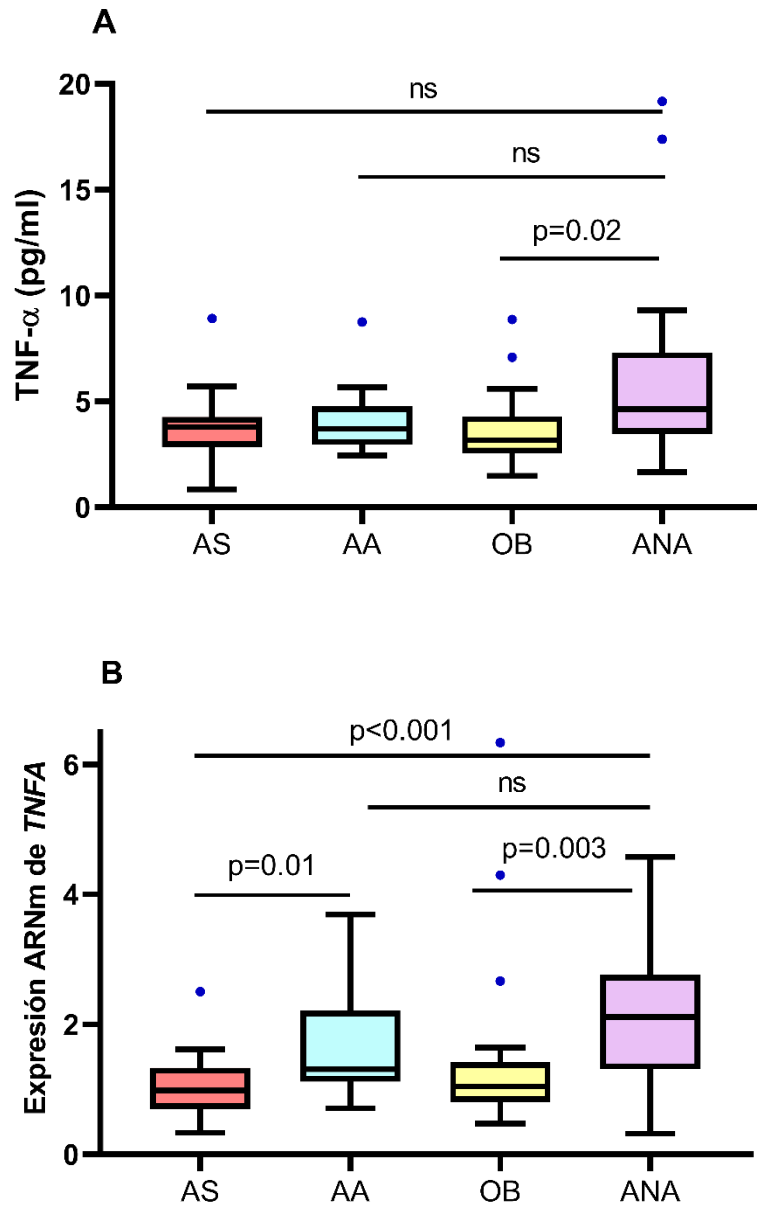


Figura 10. Valores expresados en medianas y rango intercuartil. Se realizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis con el análisis post hoc de Dunn para evaluar las diferencias en las medianas entre los grupos. AS: adolescentes sanos, AA: asma alérgica sin obesidad, OB: obesidad sin asma, ANA: asma no-alérgica con obesidad, ns: no significativo.

Perfil de metilación en el promotor de *TNFA*.

Como podemos apreciar en la Figura 11, el grupo de asma no-alérgica con obesidad presentó un menor perfil de metilación en comparación con el grupo de los adolescentes sanos ($46.9\% \pm 3.8$ vs $55.2\% \pm 4.2$, $p < 0.001$). No se demostró que el grupo de asma no-alérgica con obesidad presentara un menor perfil de metilación en el promotor de *TNFA* en comparación con el grupo de asma alérgica sin obesidad ($46.9\% \pm 3.8$ vs $48.4\% \pm 2.9$, $p = 1.0$, respectivamente) y obesidad sin asma ($46.9\% \pm 3.8$ vs $46.9\% \pm 4.4$, $p = 1.0$, respectivamente).

Es notable que el grupo de los adolescentes sanos presentó un mayor perfil de metilación al resto de los tres grupos de adolescentes enfermos. El perfil de metilación en el promotor de *TNFA* fue mayor en el grupo de los adolescentes sanos ($55.2\% \pm 4.2$) en comparación con el grupo de asma alérgica sin obesidad ($48.4\% \pm 2.9$, $p < 0.001$), el de obesidad sin asma ($46.9\% \pm 4.4$, $p < 0.001$), y asma no-alérgica con obesidad ($46.9\% \pm 3.8$, $p < 0.001$) (Figura 11).

En los modelos de regresión lineal multivariable observamos que los adolescentes en estadio de Tanner II presentaron un mayor perfil de metilación en comparación con los de estadio de Tanner IV ($\beta = -3.4$, IC95% (-6.7, -0.1), $p = 0.04$) (Tabla 8). El resto de las variables de confusión incluidas en los modelos multivariados como el sexo, edad, tiempo de evolución de la obesidad, gravedad del asma, el uso de esteroide inhalado y el tiempo de evolución del asma no demostraron ser predictoras para el perfil de metilación en el promotor de *TNFA* (Tabla 8 – Tabla 10).

Figura 11. Perfil de metilación en el promotor de *TNFA* en los cuatro grupos de adolescentes.

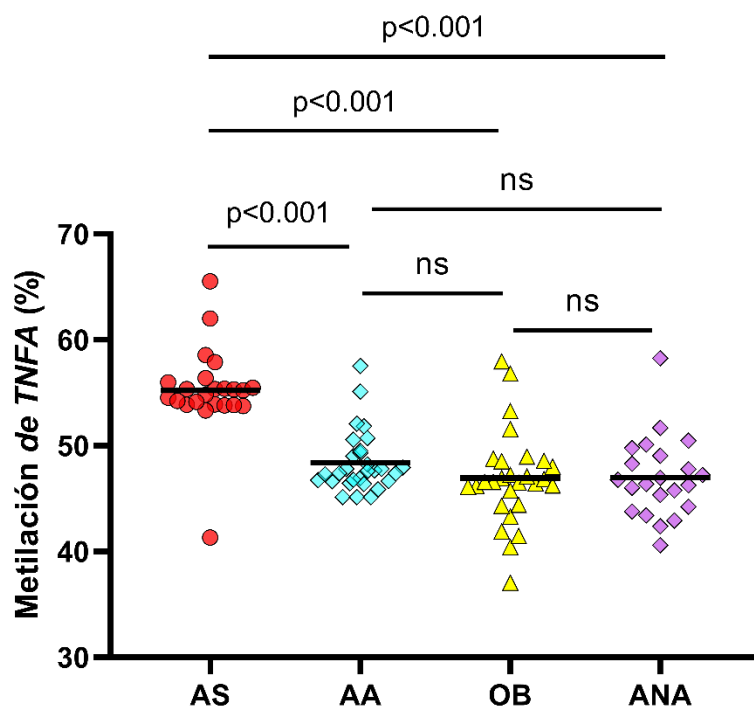


Figura 11. Valores expresados en medias. Se realizó la prueba estadística de ANOVA de una vía con el análisis post hoc de Bonferroni para evaluar las diferencias de las medias entre los grupos. AS: adolescentes sanos, AA: asma alérgica sin obesidad, OB: obesidad sin asma, ANA: asma no-alérgica con obesidad, ns: no significativo.

Concentraciones séricas de IL-17A y expresión génica de *IL17A*.

Las concentraciones séricas de IL-17A fueron mayores en el grupo de asma no-alérgica con obesidad (0.8 pg/ml (RIQ: 0.6-1.0)) en comparación con el grupo de los adolescentes sanos (0.5 pg/ml (RIQ: 0.1-0.8), $p=0.04$) y asma alérgica sin obesidad (0.4 pg/ml (IQR: 0.3-0.9), $p=0.01$) (Figura 12A). No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de asma no-alérgica con obesidad versus obesidad sin asma en el análisis no ajustado (0.8 pg/ml (RIQ: 0.6-1.0) vs 0.6 pg/ml (RIQ: 0.4-0.8), $p=0.6$, respectivamente) y en los modelos de regresión lineal multivariable (Tabla 5 - Tabla 7).

Se observó que a mayor edad en años son menores las concentraciones séricas de IL-17A ($\beta=-2.9$, IC95% (-5.2, -0.5), $p=0.01$) (Tabla 5), de la misma manera a mayor tiempo de evolución del asma son menores las concentraciones de IL-17A ($\beta=-0.6$, IC95% (-1.0, -0.2),

p=0.007) (Tabla 7). Sin embargo, a mayor tiempo de evolución de la obesidad son mayores son las concentraciones de IL-17A ($\beta=0.8$, IC95% (0.2, 1.3), p=0.007) (Tabla 6). El resto de las variables de confusión como el estadio de Tanner, la gravedad del asma y el uso de esteroide inhalado no demostraron ser predictoras para las concentraciones séricas de IL-17A (Tabla 5 – Tabla 7).

Como podemos observar en la Figura 12B la expresión génica de *IL17A* fue superior en el grupo de asma no-alérgica con obesidad (7.2 (RIQ: 5.8-8.3)) en comparación con el grupo de los sanos (0.7 (RIQ: 0.4-1.6), p<0.001), asma alérgica sin obesidad (3.8 (IQR: 3.0-6.3), p=0.04), y el grupo de obesidad sin asma (3.9 (RIQ: 2.2-4.9), p=0.001). Las adolescentes del sexo femenino demostraron una menor expresión génica de *IL17A* versus los adolescentes masculinos ($\beta = -0.3$, IC95% (-0.5, -0.01), p=0.04) (Tabla 5).

Es interesante mencionar que a mayor tiempo de evolución de la obesidad en años es menor la expresión génica de *IL17A* ($\beta = -0.4$, IC95% (-0.8, -0.06), p = 0.03) (Tabla 6). El resto de las variables de confusión incluidas en los modelos multivariados como la edad, el estadio de Tanner, la gravedad del asma, el uso de esteroide inhalado y el tiempo de evolución del asma no demostraron ser predictoras para la expresión génica de *IL17A* (Tabla 5 – Tabla 7).

Figura 12. Concentraciones séricas de IL-17A y expresión génica de *IL17A* en los cuatro grupos de adolescentes.

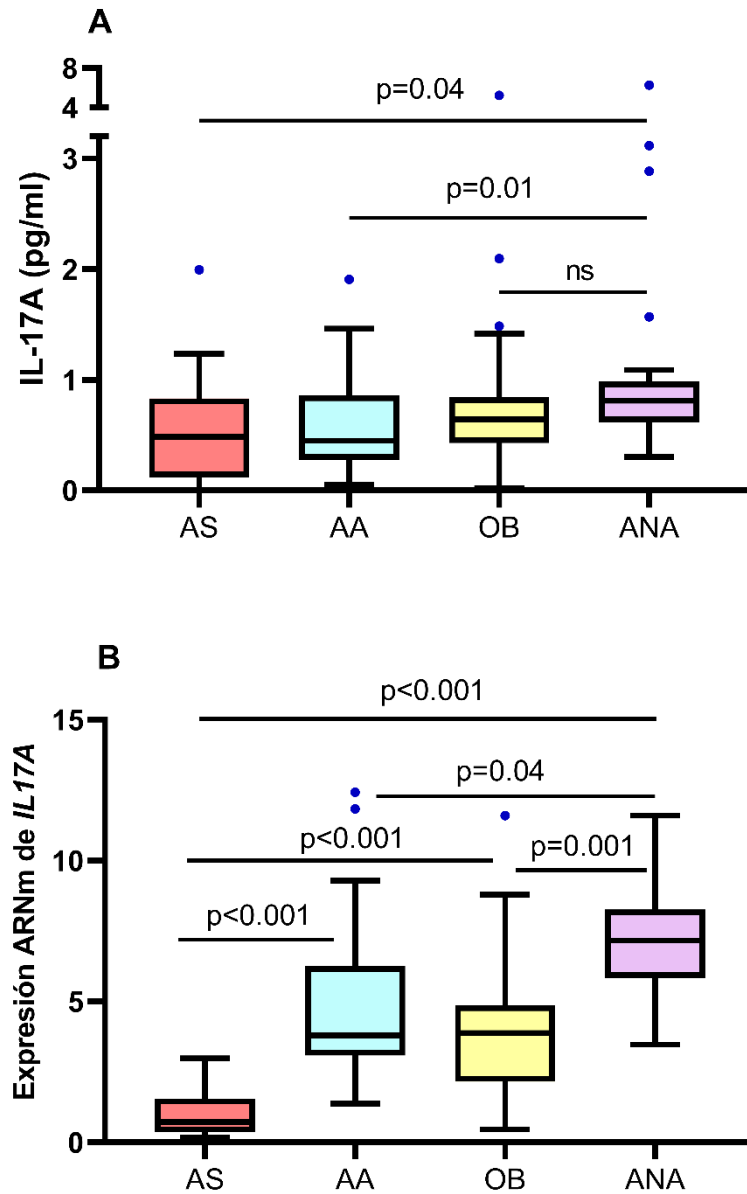


Figura 12. Valores expresados en medianas y rango intercuartil. Se realizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis con el análisis post hoc de Dunn para evaluar las diferencias en las medianas entre los grupos. AS: adolescentes sanos, AA: asma alérgica sin obesidad, OB: obesidad sin asma, ANA: asma no-alérgica con obesidad, ns: no significativo.

Perfil de metilación en el promotor de *IL17A*.

Como podemos apreciar en la Figura 13, el grupo de asma no-alérgica con obesidad presentó un menor perfil de metilación en comparación con el grupo de los adolescentes sanos ($47.3\% \pm 3.9$ vs $53.8\% \pm 2.9$, $p < 0.001$). No se observó que el grupo de asma no-alérgica con obesidad presentara un menor perfil de metilación en el promotor de *IL17A* en comparación con el grupo de asma alérgica sin obesidad ($47.3\% \pm 3.9$ vs $46.0\% \pm 6.0$, $p = 1.0$, respectivamente) y obesidad sin asma ($47.3\% \pm 3.9$ vs $45.3\% \pm 2.8$, $p = 0.6$, respectivamente).

Notablemente el grupo de los adolescentes sanos presentó un mayor perfil de metilación al resto de los tres grupos de adolescentes enfermos. El perfil de metilación en el promotor de *IL17A* fue mayor en el grupo de los adolescentes sanos ($53.8\% \pm 2.9$) en comparación con el grupo de asma alérgica sin obesidad ($46.0\% \pm 6.0$, $p < 0.001$), el de obesidad sin asma ($45.3\% \pm 2.8$, $p < 0.001$), y asma no-alérgica con obesidad ($47.3\% \pm 3.9$, $p < 0.001$).

La gravedad del asma demostró ser una variable predictora para el perfil de metilación en el promotor de *IL17A*, los adolescentes con asma leve intermitente presentaron un mayor perfil de metilación versus los de asma leve persistente ($\beta = -6.7$, IC95% (-11.7, -1.6), $p = 0.01$) y moderada persistente ($\beta = -9.7$, IC95% (-15.6, -3.8), $p = 0.002$) (Tabla 10).

El resto de las variables de confusión como sexo, edad, estadio de Tanner, tiempo de evolución de la obesidad, tiempo de evolución del asma y el uso de esteroide inhalado no demostraron ser predictoras para el perfil de metilación de *IL17A* (Tabla 8 – Tabla 10).

Figura 13. Perfil de metilación en el promotor de *IL17A* en los cuatro grupos de adolescentes.

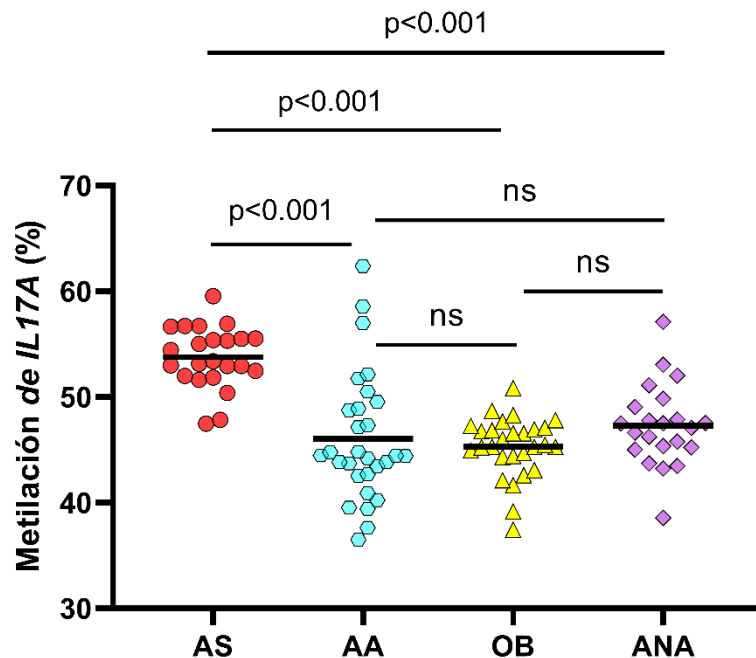


Figura 13. Valores expresados en medias. Se realizó la prueba estadística de ANOVA de una vía con el análisis post hoc de Bonferroni para evaluar las diferencias de las medias entre los grupos. AS: adolescentes sanos, AA: asma alérgica sin obesidad, OB: obesidad sin asma, ANA: asma no-alérgica con obesidad, ns: no significativo.

Expresión génica de *RORC*.

Como podemos apreciar en la Figura 14 la expresión génica de *RORC* fue mayor en el grupo de asma no-alérgica con obesidad (2.6 (IQR: 2.1-2.8)) en comparación con el grupo de los adolescentes sanos (1.0 (IQR: 0.6-1.4), $p < 0.001$), asma alérgica sin obesidad (1.6 (IQR: 1.0-2.3), $p = 0.04$) y de obesidad sin asma (0.9 (IQR: 0.8-1.0), $p < 0.001$). Las adolescentes del sexo femenino demostraron tener una mayor expresión génica de *RORC* versus los adolescentes masculinos ($\beta = 0.3$, IC95% (0.01, 0.6), $p = 0.04$) (Tabla 7).

El resto de las variables de confusión incluidas en los modelos multivariados como la edad, el tiempo de evolución de la obesidad, la gravedad del asma, el uso de esteroide inhalado, el tiempo de evolución del asma y el estadio de Tanner no demostraron ser predictoras para la expresión génica de *RORC*. (Tabla 5 - Tabla 7).

Figura 14. Expresión génica de *RORC* entre los cuatro grupos de adolescentes.

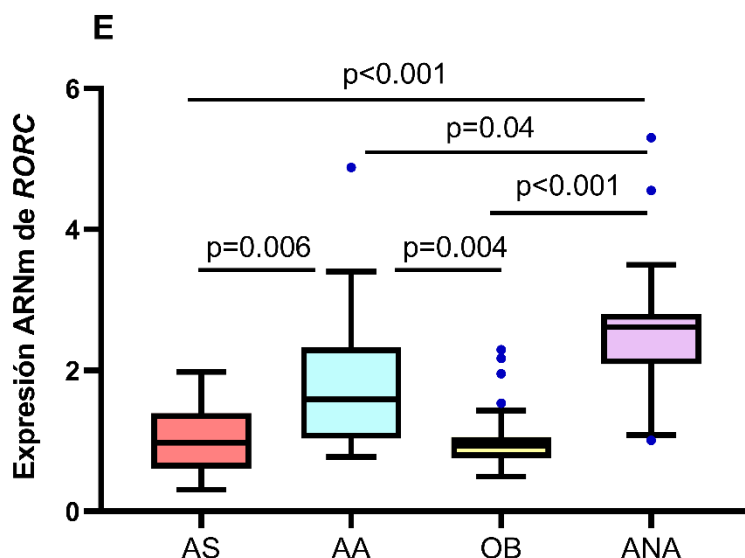


Figura 14. Valores expresados en medianas y rango intercuartil. Se realizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis con el análisis post hoc de Dunn para evaluar las diferencias en las medianas entre los grupos. AS: adolescentes sanos, AA: asma alérgica sin obesidad, OB: obesidad sin asma, ANA: asma no-alérgica con obesidad, ns: no significativo.

Perfil de metilación en el promotor de *RORC*.

Como podemos apreciar en la Figura 15 la proporción de citosinas metiladas en el promotor de *RORC* fue menor en el grupo de asma no-alérgica con obesidad ($45.4\% \pm 5.7$) en comparación con el grupo de los adolescentes sanos ($54.9\% \pm 4.1$, $p<0.001$) y de obesidad sin asma ($50.2\% \pm 4.4$), $p=0.02$). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de asma no-alérgica con obesidad versus asma alérgica sin obesidad ($45.4\% \pm 5.7$ vs $46.4\% \pm 7.0$), $p=1.0$)

El perfil de metilación en el promotor de *RORC* fue superior en los adolescentes en estadio de Tanner II en comparación con los de estadio de Tanner III ($\beta=-5.4$, IC95% (-10.4, -0.5), $p=0.03$). (Tabla 9). Interesantemente, a mayor tiempo de evolución del asma, menor perfil de metilación ($\beta=-4.8$, IC95% (-8.9, -0.7), $p=0.02$). (Tabla 10).

El resto de las variables de confusión incluidas en los modelos multivariados como el sexo, edad, el tiempo de evolución de la obesidad, la gravedad del asma, el uso de esteroide inhalado, no demostraron ser independientes para el perfil de metilación en el promotor de *RORC*. (Tabla 8 - Tabla 10).

Figura 15. Perfil de metilación en el promotor de *RORC* entre los cuatro grupos de adolescentes.

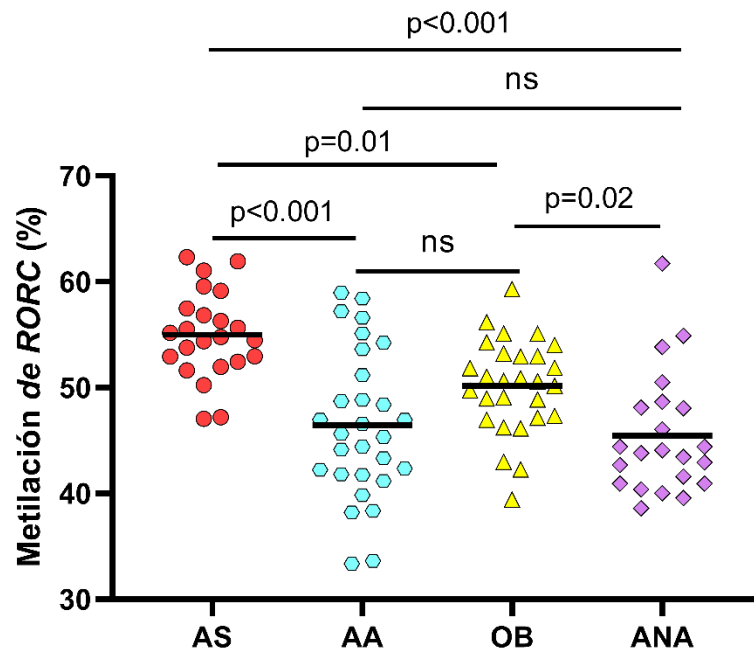


Figura 15. Valores expresados en medias. Se realizó la prueba estadística de ANOVA de una vía con el análisis post hoc de Bonferroni para evaluar las diferencias de las medias entre los grupos. AS: adolescentes sanos, AA: asma alérgica sin obesidad, OB: obesidad sin asma, ANA: asma no-alérgica con obesidad, ns: no significativo.

Tabla 5. Modelo de regresión lineal multivariable en los cuatro grupos de adolescentes.

	TNF-α n=102 R²ad=0.14		TNFA ARNm n=102 R²ad=0.127		IL-17A n=102 R²ad=0.14		IL17A ARNm n=102 R²ad=0.61		RORC ARNm n=102 R²ad=0.44	
	β (IC 95%)	p	β (IC 95%)	p	β (IC 95%)	p	β (IC 95%)	p	β (IC 95%)	p
Sexo										
Masculino	Referencia		Referencia		Referencia		Referencia		Referencia	
Femenino	-0.01 (-0.2, 0.2)	0.9	0.04 (-0.2, 0.3)	0.7	0.0 (-0.4, 0.4)	1	-0.3 (-0.5, -0.01)	0.04	0.1 (-0.05, 0.3)	0.2
Edad										
Edad, años	0.6 (-0.4, 1.6)	0.2	0.8 (-0.4, 2.0)	0.2	-2.9 (-5.2, -0.5)	0.01	-1.1 (-2.5, 0.3)	0.1	0.3 (-0.6, 1.3)	0.5
Estadio de Tanner										
Tanner II	Referencia		Referencia		Referencia		Referencia		Referencia	
Tanner III	-0.14 (-0.5, 0.2)	0.4	-0.1 (-0.5, 0.3)	0.5	0.2 (-0.5, 1.0)	0.5	0.13 (-0.3, 0.6)	0.5	-0.2 (-0.5, 0.1)	0.2
Tanner IV	-0.24 (-0.6, 0.1)	0.4	-0.25 (-0.7, 0.2)	0.3	0.7 (-0.2, 1.6)	0.1	0.15 (-0.4, 0.6)	0.6	-0.3 (-0.7, 0.1)	0.1
Tanner V	-0.06 (-0.6, 0.5)	0.8	-0.4 (-1.0, 0.2)	0.2	0.7 (-0.5, 2.0)	0.2	0.4 (-3.0, 1.2)	0.3	-0.1 (-0.7, 0.4)	0.1
Grupos										
ANA	Referencia		Referencia		Referencia		Referencia		Referencia	
AS	-0.4 (-0.7, -0.2)	0.02	-0.7 (-1.0, -0.3)	<0.001	-0.9 (-1.6, -0.3)	0.005	-2.2 (-2.6, -1.8)	<0.001	-1.0 (-1.3, -0.8)	<0.001
AA	-0.3 (-0.5, -0.03)	0.03	-0.2 (-0.4, 0.1)	0.3	-0.7 (-1.3, -0.1)	0.02	-0.5 (-0.8, -0.1)	0.01	-0.4 (-0.7, -0.2)	<0.001
OB	-0.5 (-0.7, -0.2)	<0.001	-0.5 (-0.8, -0.2)	0.003	-0.4 (-1.0, 0.2)	0.2	-0.7 (-1.1, -0.4)	<0.001	-0.9 (-1.2, -0.7)	<0.001

Abreviaturas: ad: ajustada, AS: adolescentes sanos. AA: asma alérgica sin obesidad, OB: obesidad sin asma, ANA: asma no-alérgica con obesidad.

Tabla 6. Modelo de regresión lineal multivariable en los grupos de obesidad sin asma y asma no-alérgica con obesidad.

	TNF-α n=50 R²ad=0.10		TNFA ARNm n=50 R²ad=0.127		IL-17A n=50 R²ad=0.20		IL17A ARNm n=50 R²ad=0.32		RORC ARNm n=50 R²ad=0.54	
	β (IC 95%)	p	β (IC 95%)	p	β (IC 95%)	p	β (IC 95%)	p	β (IC 95%)	p
Sexo										
Masculino	Referencia		Referencia		Referencia		Referencia		Referencia	
Femenino	0.2 (-0.1, 0.5)	0.2	-0.1 (-0.5, 0.2)	0.4	-0.2 (-0.7, 0.3)	0.4	-0.3 (-0.6, 0.08)	0.1	0.1 (-0.2, 0.3)	0.5
Edad										
Edad, años	0.3 (-1.4, 2.1)	0.7	1.6 (-0.2, 3.5)	0.08	-2.7 (-5.5, 0.1)	0.06	0.1 (-1.9, 2.1)	0.9	-0.2 (-1.6, 1.1)	0.7
Estadio de Tanner										
Tanner II	Referencia		Referencia		Referencia		Referencia		Referencia	
Tanner III	0.1 (-0.4, 0.6)	0.6	0.1 (-0.4, 0.7)	0.6	-0.1 (-0.9, 0.7)	0.8	0.1 (-0.4, 0.7)	0.6	-0.01 (-0.4, 0.4)	1.0
Tanner IV	0.04 (-0.6, 0.7)	0.9	-0.3 (-1.0, 0.4)	0.4	0.5 (-0.5, 1.5)	0.3	0.2 (-0.5, 0.9)	0.6	0.04 (-0.4, 0.5)	0.8
Tanner V	0.08 (-0.8, 0.9)	0.8	-0.5 (-1.4, 0.4)	0.3	0.9 (-0.4, 2.3)	0.2	0.1 (-0.9, 1.1)	0.8	0.1 (-0.5, 0.8)	0.7
Grupos										
ANA	Referencia		Referencia		Referencia		Referencia		Referencia	
OB	-0.5 (-0.8, -0.1)	0.01	-0.6 (-1.0, -0.2)	0.002	-0.01 (-0.6, 0.5)	0.9	-1.0 (-1.4, -0.6)	<0.001	-0.9 (-1.2, -0.7)	<0.001
Tiempo de evolución de obesidad										
Tiempo con obesidad, años	0.03 (-0.3, 0.4)	0.8	-0.4 (-0.7, 0.01)	0.06	0.8 (0.2, 1.3)	0.007	-0.4 (-0.8, -0.06)	0.03	-0.02 (-0.3, 0.2)	0.9

Abreviaturas: ad: ajustada, OB: obesidad sin asma, ANA: asma no-alérgica con obesidad.

Tabla 7. Modelo de regresión lineal multivariable en los grupos de asma alérgica sin obesidad y asma no-alérgica con obesidad.

	TNF- α n=51 R ² ad=0.16		TNFA ARNm n=51 R ² ad=0.10		IL-17A n=51 R ² ad=0.35		IL17A ARNm n=51 R ² ad=0.11		RORC ARNm n=50 R ² ad=0.34	
	β (IC 95%)	p	β (IC 95%)	p	β (IC 95%)	p	β (IC 95%)	p	β (IC 95%)	p
Sexo										
Masculino	Referencia		Referencia		Referencia		Referencia		Referencia	
Femenino	0.3 (-0.1, 0.6)	0.1	-0.2 (-0.6, 0.2)	0.3	-0.4 (-0.9, 0.08)	0.09	-0.01 (-0.3, 0.3)	0.9	0.3 (0.01, 0.6)	0.04
Edad										
Edad, años	0.1 (-1.3, 1.6)	0.8	-0.2 (-1.9, 1.4)	0.8	-1.1 (-3.4, 1.1)	0.3	-0.5 (-2.1, 1.0)	0.5	-0.4 (-1.7, 0.9)	0.6
Estadio de Tanner										
Tanner II	Referencia		Referencia		Referencia		Referencia		Referencia	
Tanner III	-0.5 (-0.9, -0.06)	0.02	-0.2 (-0.7, 0.3)	0.4	-0.1 (-0.8, 0.6)	0.7	0.03 (-0.4, 0.5)	0.9	-0.08 (-0.5, 0.3)	0.7
Tanner IV	-0.6 (-1.1, -0.02)	0.04	-0.02 (-0.7, 0.6)	0.9	0.9 (-0.03, 1.8)	0.06	0.1 (-0.5, 0.7)	0.7	-0.2 (-0.7, 0.3)	0.5
Tanner V	-0.5 (-1.2, 0.3)	0.2	0.2 (-0.7, 1.1)	0.6	0.7 (-0.6, 1.9)	0.3	0.07 (-0.8, 0.9)	0.9	0.2 (-0.5, 0.9)	0.6
Grupos										
ANA	Referencia		Referencia		Referencia		Referencia		Referencia	
AA	-0.3 (-0.5, -0.005)	0.04	-0.2 (-0.6, 0.1)	0.1	-0.5 (-0.9, -0.1)	0.02	-0.5 (-0.8, -0.2)	<0.001	-0.5 (-0.7, -0.2)	<0.001
Gravedad del asma										
Leve intermitente	Referencia		Referencia		Referencia		Referencia		Referencia	
Leve persistente	-0.2 (-0.7, 0.2)	0.3	0.2 (-0.3, 0.7)	0.4	0.4 (-0.3, 1.0)	0.3	-0.1 (-0.6, 0.3)	0.5	0.2 (-0.2, 0.6)	0.3
Moderada persistente	0.01 (-0.5, 0.5)	1.0	-0.3 (-0.9, 0.3)	0.3	0.4 (-0.4, 1.2)	0.3	-0.1 (-0.7, 0.4)	0.6	-0.1 (-0.6, 0.3)	0.6
Esteroides inhalados *										
Sin esteroide inhalado	Referencia		Referencia		Referencia		Referencia		Referencia	
Con esteroide inhalado	0.01 (-0.3, 0.3)	0.9	-0.01 (-0.4, 0.3)	0.9	0.1 (-0.3, 0.6)	0.5	-0.03 (-0.3, 0.3)	0.9	0.03 (-0.2, 0.3)	0.8
Tiempo de evolución del asma										
Tiempo con asma, años	0.2 (-0.08, 0.5)	0.2	0.1 (-0.2, 0.4)	0.5	-0.6 (-1.0, -0.2)	0.007	-0.1 (-0.4, 0.2)	0.4	0.2 (-0.04, 0.4)	0.1

*Dosis equivalente a 200-400 μ cg de budesónida. Abreviaturas: ad: ajustada, AA: asma alérgica sin obesidad, ANA: asma no-alérgica con obesidad.

Tabla 8. Modelo de regresión lineal multivariable en los cuatro grupos de adolescentes.

	Metilación TNFA n=102 R²ad=0.42		Metilación IL17A n=102 R²ad=0.34		Metilación RORC n=102 R²ad=0.26	
	β (IC 95%)	p	β (IC 95%)	p	β (IC 95%)	p
Sexo						
Masculino	Referencia		Referencia		Referencia	
Femenino	0.6 (-1.0, 2.3)	0.4	0.2 (-1.6, 2.0)	0.8	0.2 (-2.1, 2.6)	0.9
Edad						
Edad, años	2.7 (-5.7, 11.1)	0.5	4.1 (-5.4, 13.6)	0.4	1.1 (-11.3, 13.5)	0.9
Estadio de Tanner						
Tanner II	Referencia		Referencia		Referencia	
Tanner III	-1.8 (-4.5, 1.0)	0.2	0.6 (-2.5, 3.7)	0.7	-1.2 (-5.2, 2.8)	0.6
Tanner IV	-3.4 (-6.7, -0.1)	0.04	0.2 (-3.5, 3.9)	0.9	-2.2 (-7.0, 2.6)	0.4
Tanner V	-3.7 (-8.2, 0.9)	0.1	-0.9 (-6.0, 4.2)	0.7	-1.6 (-8.2, 5.1)	0.6
Grupos						
ANA	Referencia		Referencia		Referencia	
AS	8.6 (6.3, 10.9)	<0.001	6.3 (3.7, 8.8)	<0.001	9.7 (6.3, 13.1)	<0.001
AA	1.5 (-0.6, 3.7)	0.2	-1.3 (-3.7, 1.1)	0.3	1.1 (-2.0, 4.3)	0.5
OB	0.06 (-2.1, 2.2)	1.0	-2.2 (-4.6, 0.3)	0.08	4.9 (1.6, 8.1)	0.004

Abreviaturas: ad: ajustada, AS: adolescentes sanos, AA: asma alérgica sin obesidad, OB: obesidad sin asma, ANA: asma no-alérgica con obesidad.

Tabla 9. Modelo de regresión lineal multivariable en los grupos de obesidad sin asma y asma no-alérgica con obesidad.

	Metilación TNFA n=50 R²ad=0.003		Metilación IL17A n=50 R²ad=-0.001		Metilación RORC n=50 R²ad=0.18	
	β (IC 95%)	p	β (IC 95%)	p	β (IC 95%)	p
Sexo						
Masculino	Referencia		Referencia		Referencia	
Femenino	-0.1 (-2.5, 2.3)	0.9	-1.4 (-3.5, 0.6)	0.2	-0.1 (-3.1, 2.8)	0.9
Edad						
Edad, años	4.6 (-8.9, 18.2)	0.5	3.7 (-7.7, 15.2)	0.5	1.1 (-15.5, 17.7)	0.9
Estadio de Tanner						
Tanner II	Referencia		Referencia		Referencia	
Tanner III	-3.8 (-7.9, 0.3)	0.07	-1.1 (-4.5, 2.3)	0.5	-5.4 (-10.4, -0.5)	0.03
Tanner IV	-5.5 (-10.5, -0.5)	0.03	-0.8 (-5.0, 3.4)	0.7	-3.9 (-9.9, 2.2)	0.2
Tanner V	-5.8 (-12.4, 0.9)	0.09	-1.5 (-7.1, 4.1)	0.6	-2.2 (-10.3, 5.9)	0.6
Grupos						
ANA	Referencia		Referencia		Referencia	
OB	1.0 (-1.8, 3.8)	0.5	-1.7 (-4.1, 0.6)	0.1	5.4 (2.0, 8.8)	0.003
Tiempo de evolución de la obesidad						
Tiempo con obesidad, años	1.6 (-1.1, 4.3)	0.2	0.5 (-1.8, 2.8)	0.7	1.5 (-1.8, 4.7)	0.4

Abreviaturas: ad: ajustada, OB: obesidad sin asma, ANA: asma no-alérgica con obesidad.

Tabla 10. Modelo de regresión lineal multivariable en los grupos de asma alérgica sin obesidad y asma no-alérgica con obesidad.

	Metilación TNFA n=51 R²ad=-0.06		Metilación IL17A n=51 R²ad=0.09		Metilación RORC n=50 R²ad= -0.02	
	β (IC 95%)	p	β (IC 95%)	p	β (IC 95%)	p
Sexo						
Masculino	Referencia		Referencia		Referencia	
Femenino	-1.0 (-3.6, 1.5)	0.4	-1.5 (-5.2, 2.2)	0.4	-1.4 (-6.3, 3.4)	0.6
Edad						
Edad, años	2.2 (-9.2, 13.6)	0.7	6.4 (-10.1, 22.9)	0.4	6.9 (-14.6, 28.6)	0.5
Estadio de Tanner						
Tanner II	Referencia		Referencia		Referencia	
Tanner III	-1.5 (-5.0, 1.9)	0.4	1.9 (-3.2, 7.0)	0.4	0.5 (-6.1, 7.1)	0.9
Tanner IV	-3.0 (-7.5, 1.6)	0.2	3.3 (-3.4, 9.9)	0.3	0.1 (-8.5, 8.8)	0.9
Tanner V	-2.2 (-8.4, 4.1)	0.5	-0.2 (-9.3, 8.9)	0.9	0.0 (-11.9, 11.9)	1.0
Grupos						
ANA	Referencia		Referencia		Referencia	
AA	1.8 (-0.4, 3.9)	0.1	-2.9 (-6.0, 0.2)	0.07	0.4 (-3.7, 4.5)	0.8
Gravedad del asma						
Leve intermitente	Referencia		Referencia		Referencia	
Leve persistente	-0.6 (-4.1, 2.9)	0.7	-6.7 (-11.7, -1.6)	0.01	-2.0 (-8.6, 4.7)	0.6
Moderada persistente	0.6 (-3.5, 4.6)	0.8	-9.7 (-15.6, -3.8)	0.002	-5.8 (-13.4, 1.9)	0.1
Esteroides inhalados *						
Sin esteroide inhalado	Referencia		Referencia		Referencia	
Con esteroide inhalado	-0.4 (-2.9, 2.0)	0.7	0.8 (-2.7, 4.4)	0.6	2.0 (-2.6, 6.6)	0.4
Tiempo de evolución del asma						
Tiempo con asma, años	0.3 (-1.8, 2.5)	0.8	-1.6 (-4.7, 1.6)	0.3	-4.8 (-8.9, -0.7)	0.02

*Dosis equivalente a 200-400 μ cg de budesónida. Abreviaturas: ad: ajustada, AA: asma alérgica sin obesidad, ANA: asma no-alérgica con obesidad.

Correlación entre la expresión génica de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* y las concentraciones séricas de TNF- α e IL-17A.

Como era esperado y aunque fueron consideradas asociaciones débiles reportamos una correlación positiva entre la expresión génica de *TNFA* y las concentraciones séricas de TNF- α ($r_s=0.20$, $p=0.04$) (Figura 16A) y una correlación similar fue también observada entre la expresión génica de *IL17A* y las concentraciones séricas de IL-17A ($r_s=0.24$, $p=0.01$) (Figura 16B). Asimismo, como era esperado observamos una correlación moderadamente positiva entre la expresión génica de *RORC* y la expresión génica de *IL17A* ($r_s=0.43$, $p<0.001$) (Figura 16C).

Nuestros hallazgos reportaron asociaciones interesantes, observamos una correlación moderadamente positiva entre la expresión génica de *TNFA* y la expresión génica de *IL17A* ($r_s=0.38$, $p<0.001$) (Figura 16D), y similarmente entre la expresión génica de *TNFA* y *RORC* ($r_s=0.52$, $p<0.001$) (Figura 16E). Aunque fue una asociación más débil, también se documentó una correlación positiva entre la expresión génica de *RORC* con las concentraciones de TNF- α ($r_s=0.27$, $p=0.006$) (Figura 16F).

Figura 16. Correlaciones entre la expresión génica de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* y las concentraciones séricas de TNF- α e IL-17A en los cuatro grupos de adolescentes.

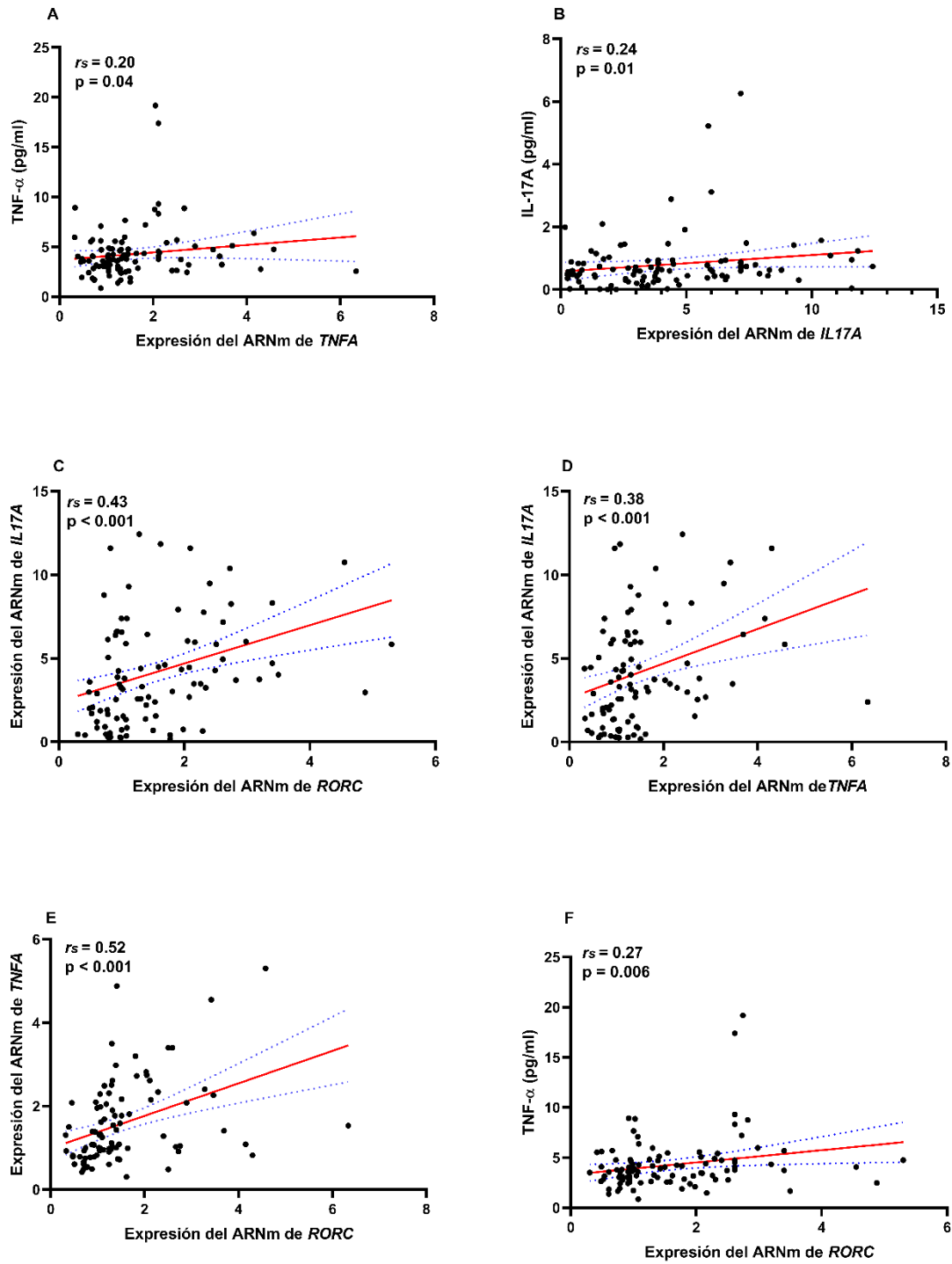


Figura 16. Las correlaciones fueron analizadas con la prueba no paramétrica de Spearman, los valores de p se muestran en las figuras.

Correlaciones entre el perfil de metilación en los promotores de los genes de *TNFA*, *IL17A* y *RORC*, y la expresión génica de *TNFA*, *IL17A* y *RORC*.

Primeramente, evaluamos el estado de metilación del gen con su respectiva expresión génica y posteriormente con su respectiva concentración sérica. Como era esperado, observamos una correlación moderadamente negativa entre la proporción de citosinas metiladas en el promotor de *TNFA* y su expresión del ARNm de *TNFA* ($r_s=-0.30$, $p=0.003$) (Figura 17A). No obstante, no reportamos una correlación negativa estadísticamente significativa entre el perfil de metilación en el promotor de *TNFA* y las concentraciones séricas de TNF- α ($r_s=-0.05$, $p=0.6$).

Asimismo, también observamos una correlación moderadamente negativa entre el grado de metilación en el promotor de *IL17A* y su expresión del ARNm de *IL17A* ($r_s=-0.30$, $p=0.003$) (Figura 17B). Sin embargo, no observamos una correlación negativa entre la proporción de citosinas metiladas en el promotor de *IL17A* y las concentraciones séricas de IL-17A ($r_s=-0.04$, $p=0.7$).

Respecto al estado de metilación en el promotor de *RORC* observamos una correlación moderadamente negativa con su expresión del ARNm de *RORC* ($r_s=-0.38$, $p<0.001$) (Figura 17C). Similarmente, también documentamos una correlación moderadamente negativa entre el perfil de metilación en el promotor de *RORC* y la expresión génica de *IL17A* ($r_s=-0.37$, $p<0.001$) (Figura 17D).

Aunque fueron asociaciones más débiles también observamos una correlación negativa entre el perfil de metilación en el promotor de *RORC* y la expresión génica de *TNFA* ($r_s=-0.26$, $p=0.009$) (Figura 17E), y entre el perfil de metilación en el promotor de *RORC* y las concentraciones séricas de TNF- α ($r_s=-0.21$, $p=0.03$) (Figura 17F).

El perfil de metilación en el promotor de *RORC* correlacionó positivamente con el grado de metilación en el promotor de *IL17A* ($r_s=0.30$, $p=0.003$) (Figura 17G). Una correlación similar, aunque considerada más débil fue observada entre el perfil de metilación en el promotor de *RORC* y en el de *TNFA* ($r_s=0.26$, $p=0.009$) (Figura 17H).

Respecto al grado de metilación en el promotor de *TNFA* observamos una correlación moderadamente negativa con la expresión génica de *IL17A* ($r_s=-0.46$, $p<0.001$) (Figura 17I) y una correlación similar fue observada entre el perfil de metilación en el promotor de *TNFA* y la expresión génica de *RORC* ($r_s=-0.33$, $p=0.001$) (Figura 15J).

Se observó una correlación moderadamente positiva entre el perfil de metilación en el promotor de *TNFA* y en el de *IL17A* ($r_s=0.42$, $p<0.001$) (Figura 17K).

Figura 17. Correlación entre el perfil de metilación en los promotores de los genes de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* y la expresión génica de *TNFA*, *IL17A* y *RORC*.

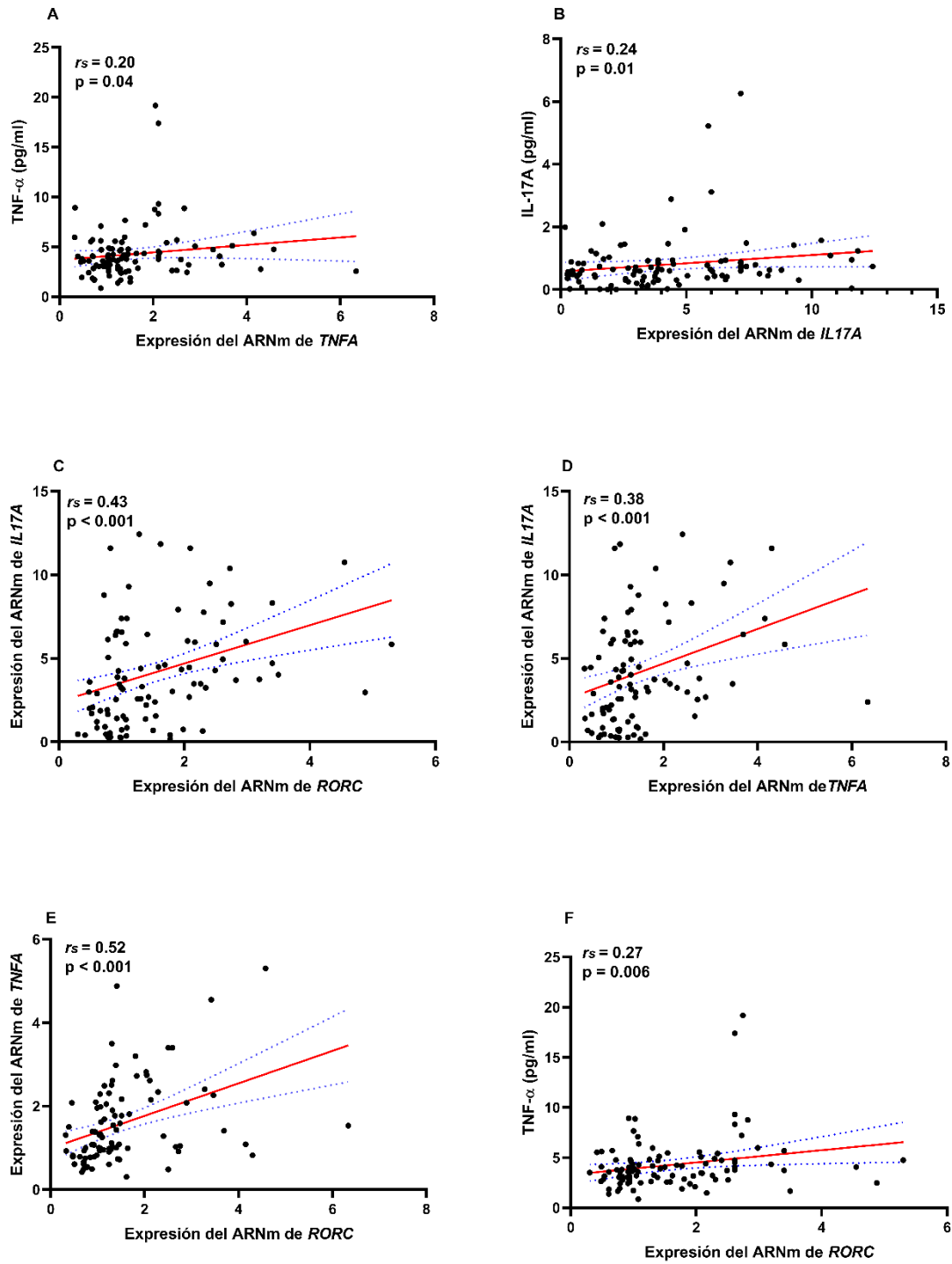


Figura 17. Las correlaciones fueron analizadas con la prueba no paramétrica de Spearman, los valores de p se muestran en las figuras.

Figura 17. Correlación entre el perfil de metilación en los promotores de los genes de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* y la expresión génica de *TNFA*, *IL17A* y *RORC*.

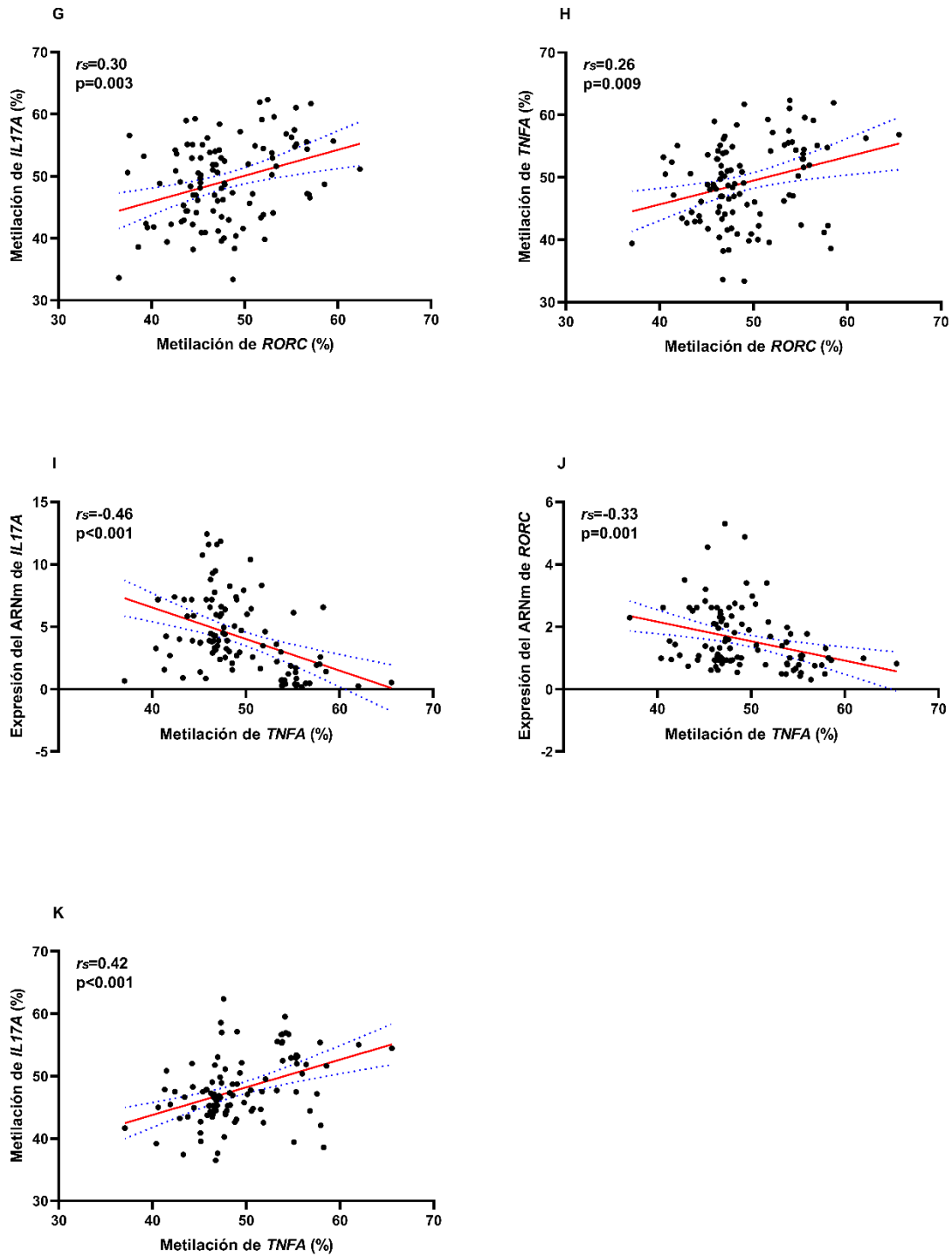


Figura 17. Las correlaciones fueron analizadas con la prueba no paramétrica de Spearman, los valores de p se muestran en las figuras.

DISCUSIÓN

El fenotipo de asma no-alérgica asociada a la obesidad es caracterizado por ser clínicamente más grave, con resistencia a los esteroides inhalados, de mayor difícil control, más común en mujeres y con un perfil inmunológico no-Th2 [20,21]. Una de las características clínicas más importantes es la temporalidad; la obesidad debe de preceder al inicio del asma [20,21]. Este estudio intenta replicar el fenotipo asmático no-tipo 2 descrito inicialmente por Holguin et al. [20] en adultos con obesidad en una muestra de adolescentes.

Respecto a las concentraciones séricas de TNF- α nuestra hipótesis se cumple parcialmente en el análisis no ajustado; sin embargo, en los modelos multivariantes se cumple en su totalidad; las concentraciones de TNF- α fueron superiores en el grupo de asma no-alérgica con obesidad en comparación con los adolescentes sanos, con asma alérgica sin obesidad y obesidad sin asma. Nuestros hallazgos son similares a lo reportado por Rastogi et al. [59] quien demostró que las concentraciones de TNF- α fueron mayores en adolescentes con asma y obesidad versus los adolescentes con asma sin obesidad (0.60 pg/ml \pm 0.46 vs 0.29 pg/ml \pm 0.44, $p=0.008$).

La expresión génica de *TNFA* fue mayor en el grupo de asma no-alérgica con obesidad comparado con el grupo de los sanos y obesidad sin asma; sin embargo, no observamos una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de asma no-alérgica con obesidad versus asma alérgica sin obesidad. Una posible explicación es que la biología de la expresión génica de *TNFA* es fundamental en ambos fenotipos de asma y como resultado no es posible que exista una diferencia significativa [18,19,123].

Está bien estudiado que en la inmunología del asma alérgica el TNF- α causa un daño importante en el epitelio respiratorio y de la misma manera en el asma no-alérgica asociada a la obesidad; no obstante, la fuente de TNF- α es diferente en ambos fenotipos; en el asma alérgica la principal fuente son los mastocitos localizados en la mucosa del epitelio respiratorio y en el asma no-alérgica asociado a la obesidad son los macrófagos M1 localizados principalmente en el tejido adiposo visceral [18,19,123].

Respecto a las concentraciones de IL-17A los adolescentes con asma no-alérgica con obesidad presentan mayores concentraciones séricas de IL-17A en comparación con el grupo de los sanos y asma alérgica sin obesidad; sin embargo, en ninguno de los análisis

estadísticos reportamos que los adolescentes con asma no-alérgica con obesidad presentaran mayores concentraciones de IL-17A versus el grupo de obesidad sin asma.

El estudio Rastogi et al. [59] en Nueva York obtuvo resultados similares a nuestra investigación, su estudio demostró que no existen diferencias significativas en las concentraciones séricas de IL-17A entre los grupos de adolescentes con asma y obesidad versus el grupo de obesidad sin asma ($p=0.85$); no obstante, el estudio de Rastogi et al. [59] no especifica si es el grupo de asma con obesidad son no-alérgicos, asimismo tampoco está clarificado la temporalidad, si la obesidad precedió al asma.

En contraste, Dias et al. [68] demostró que pacientes con asma y obesidad presentan mayores concentraciones de IL-17A en comparación con los pacientes sanos, con asma sin obesidad y obesidad sin asma. Sin embargo, el estudio de Días et al. [68] es diferente a nuestro estudio; primero porque las concentraciones de IL-17A fueron medidas en cultivos de clones de células T activadas CD4+, y en segundo lugar las características clínicas de los pacientes en el estudio de Días et al. [68] fueron muy distintas a nuestro estudio. Días et al. [68] estudió a pacientes adultos con asma alérgica y obesidad, además su estudio no especifica la temporalidad de los hechos, si la obesidad precedió al diagnóstico del asma; por lo tanto, no es exactamente el fenotipo asmático no-tipo 2 que estamos estudiando en nuestro proyecto.

A diferencia de nuestro estudio, Días et al. [68] sí demostró que los pacientes con asma y obesidad presentan mayores concentraciones de IL-17 en comparación con los pacientes con obesidad sin asma ($p=0.0011$); es posible que en el estudio de Días et al. [68] la combinación del perfil alérgico Th2 y el perfil Th17 de la obesidad podrían incrementar la producción de IL-17A, como fue lo reportado por Liu et al. [124]. Una potencial explicación por la cual nosotros no demostramos una diferencia significativa de la IL-17A entre estos dos grupos es que la biología de la IL-17A es tan importante en la inmunología de la obesidad como en la inmunología del fenotipo asmático no-tipo 2; por lo tanto, es posible que no existan diferencias significativas entre estos dos grupos de pacientes [19, 21-24, 61-64].

Como pudimos apreciar en los resultados respecto a la expresión génica de *IL17A* y *RORC* nuestra hipótesis se cumple en su totalidad; la expresión génica de *IL17A* y *RORC* fue mayor en el grupo de asma no-alérgica con obesidad en comparación con los grupos de adolescentes sanos, con asma alérgica sin obesidad y obesidad sin asma.

Nuestros hallazgos son consistentes con lo reportado por Marijsse et al. [66], quien demostró que los pacientes adultos con asma y obesidad tienen una mayor expresión génica de *IL17A* versus los pacientes con asma sin obesidad (5.74 (IC95%: 3.01–8.45) vs 1.65 (IC95%: 0.49–5.27), $p = 0.003$, respectivamente). Resultados similares fueron observados en niños entre 7-8 años por Wu et al. [67], la expresión génica de *IL17A* y *RORC* fue mayor en niños con asma con sobrepeso/obesidad en comparación con los niños con asma sin sobrepeso/obesidad ($p < 0.001$; $p < 0.5$, respectivamente).

Aunque los adolescentes con asma leve intermitente presentaron un mayor perfil de metilación en el promotor de *IL17A*, nuestros hallazgos demostraron que no había diferencias significativas en las concentraciones séricas de TNF- α e IL-17A y en la expresión génica de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* entre los grupos de asma leve intermitente, leve persistente y moderada persistente, probablemente porque la muestra de adolescentes con asma fue muy homogénea y la gran mayoría de ellos padecen asma leve persistente.

Finalmente, tomando en cuenta todos nuestros resultados; las concentraciones de TNF- α y la expresión génica de *IL17A* y *RORC* fueron significativamente mayores en el grupo de asma no-alérgica con obesidad en comparación con los grupos de adolescentes sanos, asma alérgica sin obesidad y obesidad sin asma. Es posible que 5 potenciales mecanismos podrían explicar la plausibilidad biológica de este fenómeno.

El primer mecanismo podría ser explicado por el número de macrófagos M1; de acuerdo con el estudio de Periyalil et al. [34] los pacientes con asma no-alérgica y obesidad tienen un mayor número de macrófagos M1 en el tejido adiposo visceral en comparación con los pacientes con obesidad sin asma (2.43 millones células/ml vs 1.15 millones células/ml, $p = 0.039$, respectivamente), los macrófagos M1 son la principal fuente de TNF- α en la obesidad; y como resultado, los adolescentes con asma no-alérgica con obesidad podrán tener mayores concentraciones séricas de TNF- α en comparación con el resto de los tres grupos de adolescentes como fue lo observado en nuestro estudio.

Los macrófagos M1 son excelentes productores de IL-6 [33]; si de acuerdo con el estudio de Periyalil et al. [34] el fenotipo de asma no-alérgica con obesidad tiene un mayor número de macrófagos M1 en el tejido adiposo visceral; por lo tanto, es probable que los adolescentes con asma no-alérgica con obesidad podrían presentar mayores concentraciones séricas de IL-6.

La IL-6 se une a su receptor IL-6R y a la glicoproteína 130, las cuales activan río abajo a JAK1/JAK2. JAK1 y JAK2 activas fosforilan directamente al transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3), y este activador se une directamente a la cromatina del linfocito T naïve CD4+ para activar la expresión génica de *RORC* [44]. Aunque en nuestro estudio no se midieron las concentraciones séricas de IL-6, sería razonable asumir que el grupo de asma no-alérgica con obesidad podría tener mayores concentraciones de IL-6 en comparación con los otros tres grupos y en consecuencia tener una mayor expresión génica de *IL17A* y *RORC* como fue lo observado en nuestro estudio.

El gen de *RORC* es el gen regulador del factor de transcripción RORC; el cual es el factor de transcripción maestro para la diferenciación de los linfocitos Th17; RORC es tan esencial para la diferenciación de los linfocitos Th17 que estudios en modelos murinos con una deficiencia del gen *RORyt* se inhibe la diferenciación de los linfocitos Th17 en un 80% [50,52,53].

El factor de transcripción RORC estimula la expresión del ARNm de *IL17A*, el cual codifica para su proteína IL-17A. Es interesante mencionar que nuestro estudio apoya esta teoría, nosotros demostramos una correlación moderadamente positiva entre la expresión génica de *RORC* e *IL17A*, y entre la expresión del ARNm de *IL17A* e IL-17A.

La expresión génica de *RORC* fue mayor en las adolescentes del sexo femenino posiblemente porque los estrógenos incrementan el porcentaje del tejido adiposo durante la pubertad [125]; por lo tanto, las adolescentes femeninas al tener una mayor proporción de tejido adiposo podrían tener un mayor número de macrófagos M1 y como resultado mayores concentraciones de IL-6 y en consecuencia una mayor expresión génica de *RORC*.

Estos hallazgos son consistentes con lo publicado por Castro-Rodríguez et al. [15] en su cohorte en Arizona, en donde observo que las niñas, pero no en los niños, quienes en el seguimiento llegaban a tener obesidad presentaban casi 7 veces más riesgo de presentar sibilancias OR: 6.8 (IC95%: 2.4-19.4, $p < 0.01$), más recientemente el estudio de Wadden et al. [126] en una cohorte canadiense de 571,790 niños y 549,230 niñas, quienes iniciaron su reclutamiento entre los 0-2 años y se siguieron durante 8 años, demostró que las niñas y no los niños que aumentaban su IMC tenían cuatro veces más riesgo de padecer asma (OR:4.09 (IC95%: 1.04-16.15, $p = 0.0442$)).

El segundo mecanismo podría ser explicado por la activación de RORC por medio de los ácidos grasos como un ligando dependiente. De acuerdo al estudio de Endo et al. [47] un segundo mecanismo ocurre por medio de la enzima acetil-CoA carboxilasa-1 (ACC1); enzima clave para la síntesis de los ácidos grasos monoinsaturados y los oxisteroles, los cuales están incrementados en la obesidad, estos ácidos grasos activan directamente a RORC como un ligando dependiente, posteriormente RORC forma un complejo con un co-activador de histonas acetiltransferasa (p300), este complejo se une a la cromatina del linfocito Th17 para estimular la expresión génica de *IL17A*.

El estudio de Del-Río-Navarro et al. [127] en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, demostró que los adolescentes con asma y obesidad presentan mayores concentraciones séricas de ácidos grasos en comparación con los adolescentes sanos y asma sin obesidad; por lo tanto, los adolescentes con asma no-alérgica con obesidad podrían tener un incremento en la expresión génica de *RORC* e *IL17A* como fue lo observado en nuestro estudio. Aunque en nuestro proyecto se excluyeron a los adolescentes con hiperlipidemia, es valioso señalar que esta vía metabólica de los lípidos es importante para la expresión génica de *RORC* e *IL17A* en este fenotipo asmático no-T2.

El tercer mecanismo podría ser explicado por el modelo del tejido adiposo disfuncional; en donde existe un ciclo inmunológico con una retroalimentación positiva entre el macrófago M1 y el linfocito Th17 [28]. En la obesidad la gran mayoría de la estirpe celular en el tejido adiposo visceral son los macrófagos M1 productores de las interleucinas proinflamatorias IL1- β , IL-6, IL-15 e IL-23, las cuales se dirigen a los receptores de los linfocitos T naïve CD4+ para diferenciarlos y activarlos en linfocitos Th17 [28,128].

El linfocito Th17 diferenciado y activo sintetiza IL-17A, la IL-17A activa a los macrófagos M1, quienes activos secretan IL1- β , IL-6, IL-15 e IL-23; nuevamente este grupo de citocinas diferenciaran y activaran a más linfocitos Th17, cómo podemos apreciar hay un ciclo inmunológico entre el macrófago M1 y el linfocito Th17, estimulándose recíprocamente por medio de estas citocinas [28].

La teoría del tejido adiposo disfuncional es respaldada por nuestros hallazgos; existe una correlación moderadamente positiva entre la expresión del ARNm de *TNFA* y *RORC*, entre la expresión del ARNm de *TNFA* e *IL17A*, y entre las concentraciones séricas de TNF- α y la expresión del ARNm de *RORC*; la interpretación biológica podría ser que existe una interacción inmunológica-molecular entre el macrófago M1 (*TNFA* y TNF- α) y el linfocito

Th17 (*IL17A* y *RORC*), y como resultado habrá un incremento en la expresión génica de *TNFA*, *IL17A* y *RORC*, y en las concentraciones séricas de TNF- α e IL-17A.

Es posible que en el modelo del tejido adiposo disfuncional en los adolescentes con el fenotipo asmático no-tipo 2 la red transcripcional de *RORC* y *TNFA* podrían estimularse recíprocamente con una retroalimentación positiva; y por lo tanto nos podríamos explicar una regulación a la alta en la expresión del ARNm de *RORC* en los adolescentes con asma no-alérgica y obesidad como fue lo observado en nuestro estudio.

El cuarto mecanismo podría ser explicado por el incremento en las concentraciones séricas de leptina y la disminución de la adiponectina, ambas hormonas posiblemente juegan un papel importante en la biología de la inflamación de bajo grado de la obesidad al inicio de la pubertad. El estudio de Deng et al. [129] en un modelo murino demostró que los linfocitos T CD4+ que son cultivados con leptina incrementan significativamente la expresión génica de *ROR γ t*. Asimismo, la leptina incrementa la expresión del ARNm de *TNFA* y las concentraciones de TNF- α por medio de la fosfolipasa D1 [130]. Por otro lado, el estudio de Kashara et al. [131] reportó un incremento en la expresión del génica de *IL17A* en ratones deficientes de adiponectina.

En pacientes con lupus eritematoso sistémico Yu et al. [132] documentó que las concentraciones séricas de leptina incrementa la expresión génica de *RORC* y la síntesis de IL-17A. Recientemente el estudio de Went et al. [133] reportó que la leptina induce la expresión génica de *RORC* y la producción de IL-17A por medio de las ILC2 en pacientes con rinitis alérgica; de hecho, en ese estudio se documentó una correlación positiva entre las concentraciones de leptina sérica y el porcentaje de células ILC2 productoras de IL-17A ($r=0.64$, $p=0.001$).

El estudio de Días et al. [68] en adultos con asma y obesidad demostró una correlación positiva entre las concentraciones séricas de leptina e IL-17A ($r=0.5664$, $p=0.0011$); asimismo, el estudio de Al-Ayed et al. [134] reportó que los adolescentes con asma y obesidad presentan mayores concentraciones séricas de leptina en comparación con los adolescentes con asma sin obesidad ($p<0.001$).

Aunque en nuestro estudio no se midieron las concentraciones séricas de leptina, podemos asumir que los adolescentes con asma no-alérgica con obesidad podrían tener mayores concentraciones de leptina versus los otros tres grupos de adolescentes; esto podría explicar porque las adolescentes con el fenotipo asmático no-tipo 2 presentan mayores

concentraciones de TNF- α y expresión génica de *IL17A* y *RORC* versus los otros tres grupos de adolescentes en nuestra investigación.

De acuerdo con nuestros resultados, la expresión del ARNm de *RORC* fue mayor en las adolescentes del sexo femenino, este fenómeno también podría estar explicado por las concentraciones de leptina. García-Mayor et al. [135] reportó que las concentraciones de leptina son mayores en niñas en comparación con los niños; de hecho, el estudio de Nagel et al. [136] demostró que las niñas con concentraciones más elevadas de leptina tienen 13 veces más posibilidades de padecer asma no-alérgica (OR: 13.34 (IC95%: 3.18-55.97)); es interesante destacar que esta asociación no se observó en los niños. Resultados similares en población adulta fueron documentados por Newson et al. [137], quien reportó que la leptina está asociada positivamente con el asma, particularmente en mujeres (Somers' $D=0.20$ (IC95%: 0.08-0.30), $p=0.00079$).

De acuerdo con nuestros resultados en los modelos de regresión lineal multivariable; a mayor edad y a mayor tiempo de evolución del asma serán menores las concentraciones séricas de IL-17A, y a mayor tiempo de evolución de la obesidad serán menor la expresión del ARNm de *IL17A*; y en coincidencia, a mayor estadio de Tanner menor serán las concentraciones séricas de TNF- α . Posiblemente al inicio de la pubertad hay un estallido inflamatorio desencadenado por un incremento en las concentraciones séricas de IL-17A y TNF- α que posteriormente van disminuyendo con la edad [54].

El estudio de Blum et al. [138] demostró que los adolescentes masculinos en estadio de Tanner II presentan mayores concentraciones séricas de leptina en comparación con los estadios III-V; asimismo, García-Mayor et al. [135] reportó que en los niños y en las niñas específicamente cuando ellos inician su etapa puberal presentan mayores concentraciones de leptina. Aparentemente el incremento de leptina al inicio de la pubertad podría explicar la elevación de las concentraciones séricas de TNF- α e IL-17A, y una mayor expresión génica de *IL17A* en los adolescentes más jóvenes en nuestro estudio.

Estos hallazgos son consistentes con lo que reportó Castro-Rodriguez et al. [15] en su cohorte de adolescentes en Arizona, observó que las niñas de 6 años quienes llegaban a presentar obesidad y que la pubertad había iniciado antes de los 11 años, tenían 7 veces más posibilidades de padecer sibilancias a los 13 años OR 6.8 (IC95%: 2.4-19.4, $p<0.01$), esta asociación no se observó en las niñas quienes la pubertad inicio después de los 11 años.

Es probable que los adolescentes con un estadio de Tanner II en este estudio habrían iniciado su pubertad antes de los 11 años, similar a lo que observo Castro-Rodriguez et al. [15] en su cohorte de adolescentes; no obstante, no contamos con los datos exactos a que edad se inició la pubertad en los adolescentes de nuestro estudio. Aunque en nuestra investigación no se midieron las concentraciones séricas de leptina, es razonable asumir que los adolescentes en un estadio de Tanner II podrían tener mayores concentraciones de leptina versus los otros tres estadios y por lo tanto podría explicar porque las adolescentes con Tanner II en nuestro estudio presentan mayores concentraciones de TNF- α en comparación con las de Tanner III y IV.

Aunque en los adolescentes en estadio de Tanner II presentaron un mayor perfil de metilación en los promotores de *TNFA* y *RORC*, es importante mencionar que no se reflejó con una menor una expresión génica de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* en ese grupo, así como una disminución en las concentraciones séricas de TNF- α e IL-17A.

Por la teoría previamente descrita y nuestros hallazgos en los modelos multivariados, los médicos generales, los pediatras y los alergólogos inmunólogos pediatras deberían prestar más atención a las adolescentes del sexo femenino con un diagnóstico reciente de obesidad que inician la etapa de la pubertad, ya que podrían ser el grupo más vulnerable para el desarrollo de asma asociado a la obesidad.

Finalmente, el quinto mecanismo podría ser explicado por la epigenética, particularmente la metilación de los promotores de los genes de *TNFA*, *IL17A* y *RORC*. Nuestros hallazgos demostraron datos interesantes; a menor proporción de citosinas metiladas en los promotores de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* es mayor la expresión de su ARNm respectivamente; por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la metilación en los promotores de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* pudieran estar regulando la expresión génica de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* respectivamente.

Sin embargo, nuestra hipótesis no se cumplió totalmente como se planteó. Respecto al perfil de metilación en los promotores de *TNFA* e *IL17A* en los adolescentes con asma no alérgica con obesidad solo fue menor versus los adolescentes sanos, no demostramos que el perfil de metilación fuera menor en comparación con los adolescentes con asma alérgica sin obesidad y obesidad sin asma.

Respecto a nuestros resultados del perfil de metilación en el promotor de *TNFA*, nuestros hallazgos difieren a los del estudio de Jeong et al. [105], aunque en ese estudio no se midió específicamente la proporción de las citosinas metiladas en el promotor de *TNFA*, no se reportó una diferencia significativa en los promotores de los 38 genes y 537 sitios de la súper familia de TNF- α entre los adultos con asma no-alérgica con obesidad versus los controles sanos.

Nuestra hipótesis se cumplió parcialmente respecto al patrón de metilación en el promotor de *RORC*; el grupo de adolescentes con asma no-alérgica con obesidad presento un menor perfil de metilación en comparación con el grupo de los sanos y el de obesidad sin asma, sin embargo, no observamos diferencias significativas entre los grupos de asma no-alérgica con obesidad versus asma alérgica sin obesidad.

Es importante mencionar que el perfil inmunológico que predomina en la obesidad es el Th17 y por lo tanto también hay un aumento en la expresión génica de *IL17A* y *RORC* [61-64], sin embargo es valioso resaltar que en nuestro estudio la expresión génica de *IL17A* y *RORC* fue mayor, y el perfil de metilación en el promotor de *RORC* fue menor en el grupo de asma no-alérgica con obesidad versus obesidad sin asma; por lo tanto sería lógico postular que un menor grado de metilación en el promotor de *RORC* podría explicar una mayor polarización del perfil Th17 observada en el grupo de asma no-alérgica con obesidad.

Nuestros hallazgos se reportaron similares al estudio de Jeong et al. [105], aunque en ese estudio no se midió específicamente la proporción de las citosinas metiladas en los promotores de *IL17A* y *RORC*, ese estudio reporto que el perfil de metilación en los promotores de los genes de la vía NLRP3-IL1B-IL17 en donde están incluidos los promotores de *IL17A* y *RORC*, fue menor en los adultos con asma no-alérgica y obesidad en comparación con los controles sanos.

Como previamente mencionamos, es posible que exista un ciclo inmunológico con una retroalimentación positiva entre el macrófago M1 (*TNFA* y TNF- α) y el linfocito Th17 (*IL17A*, y *RORC*) [28], nuestros hallazgos en la metilación apoyan esta teoría. Nosotros reportamos correlaciones moderadamente negativas entre el perfil de metilación en el promotor de *TNFA* y la expresión génica de *IL17A* y *RORC*, y entre el perfil de metilación en el promotor de *RORC* y la expresión génica de *TNFA*, y similarmente entre el perfil de metilación en el promotor de *RORC* y las concentraciones de TNF- α . Adicionalmente observamos una

correlación moderadamente positiva entre el perfil de metilación en el promotor de *TNFA* con el promotor de *IL17A* y *RORC*, respectivamente.

Asimismo, *RORC* es el factor de transcripción maestro para la diferenciación de los linfocitos Th17 y por lo tanto para la expresión génica de *IL17A* [52,53]. El presente estudio sugiere que la metilación en el promotor de *RORC* podría regular la expresión génica de *IL17A*, nuestros hallazgos demostraron una asociación moderadamente negativa, en donde a menor proporción de citosinas metiladas en el promotor de *RORC* será mayor la expresión génica de *IL17A*. Los resultados del presente estudio son consistentes con lo que documentó Mazzoni et al. [95], en donde el patrón de metilación en el promotor de *RORC* en una mezcla linfocitos Th17 era prácticamente nulo; en consecuencia, la expresión génica de *IL17A* en este grupo de linfocitos tendría una regulación a la alta.

Por los hallazgos observados en nuestro estudio, podemos asumir que la red transcripcional de *RORC* como el gen regulador del factor de transcripción maestro para la diferenciación de los linfocitos Th17 juega un papel biológico importante en la inmunología del asma no alérgica asociada a la obesidad.

Nosotros pensamos que la principal fortaleza de nuestro estudio fue la adecuada selección de los pacientes. Los investigadores clínicos que participamos en este estudio realizamos una rigurosa historia clínica, tratando de construir una temporalidad, asegurándonos que la obesidad precediera a los síntomas y al diagnóstico de asma, tratando de seleccionar el fenotipo asmático no-tipo2 lo mejor posible, sin embargo, los sesgos de memoria siempre son posibles.

Este estudio tiene algunas limitaciones que necesitan ser consideradas.

- 1) Es un estudio piloto que incluye un pequeño número de muestra y por lo tanto en algunos contrastes de hipótesis se tiene un bajo poder estadístico.
- 2) El diseño transversal no cuenta con la temporalidad de los hechos; por lo tanto, es imposible evaluar una relación causa-efecto. Asimismo, este diseño es vulnerable a potenciales sesgos de memoria.
- 3) Nosotros medimos la expresión génica y el perfil de metilación en los promotores de los genes estudiados en leucocitos de sangre periférica; en consecuencia, no sabemos si estamos evaluando un linfocito T, linfocito B o monocitos. Idealmente, deberíamos haber realizado una citometría de flujo para cuantificar la proporción de

linfocitos Th17 e ILC3, además de haber realizado la expresión génica y la medición de las citocinas metiladas en este grupo celular.

- 4) Biológicamente sería ideal haber obtenido macrófagos M1 del tejido adiposo visceral para realizar la medición de la expresión génica y el perfil de metilación en el promotor de *TNFA*, sin embargo, por razones éticas y de factibilidad no se podría haber realizado.
- 5) Aunque el TNF- α y la IL-17A son muy importantes porque participan en la inflamación crónica de bajo grado de la obesidad y en el daño pulmonar en el asma, es importante haber estudiado a la mayoría de las citocinas que participan en la diferenciación del linfocito Th17 como el TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-21 y la IL-23.
- 6) Este estudio solo explora un sitio CpG por cada promotor de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* respectivamente, es probable que varios sitios CpG estén regulando su expresión génica, y por lo tanto sería valioso explorar más sitios CpG.

Nosotros consideramos a estas limitaciones como metodológicamente importantes, por lo tanto, los hallazgos de nuestro estudio deberían ser interpretados con cautela.

Indudablemente el mejor diseño para evaluar nuestra hipótesis es una gran cohorte de adolescentes con obesidad sin asma, con un análisis cuidadoso de la dinámica de las citocinas, la expresión génica y el perfil de metilación en cada determinado punto en el tiempo.

Más estudios en inmunología básica y clínica deberían de realizarse para clarificar la plausibilidad biológica de este fenómeno; sin embargo, las consecuencias biológicas de una regulación a la alta en la expresión génica de *RORC* podría jugar un papel esencial en el fenotipo del asma asociado a la obesidad.

CONCLUSIÓN

El presente estudio sugiere una asociación de las concentraciones séricas de TNF- α y de IL-17A y de la expresión génica de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* en leucocitos de sangre periférica con el fenotipo asmático no-tipo 2.

Una regulación a la alta en la red transcripcional *RORC* podría jugar un papel fundamental en la plausibilidad biológica del asma no-alérgica asociado a la obesidad,

y las modificaciones epigenéticas como un menor perfil de metilación en el promotor de *RORC* podría explicar una mayor polarización de la respuesta Th17 en este fenotipo.

Sin embargo, debido a las importantes limitaciones de este estudio, un estudio longitudinal con un mayor número de muestra, un repertorio más amplio de citocinas y una exploración de un mayor número de sitios CpG en las regiones promotoras es necesario para clarificar el papel biológico de la expresión génica y el grado de metilación de *TNFA*, *IL17A* y *RORC* en el fenotipo asmático no-tipo 2.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Obesity and overweight. [internet] [Accessed July 20, 2019]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
2. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384(9945):766-781.
3. Finkelstein EA, Khavjou OA, Thompson H, Trogon JG, Pan L, Sherry B, et al. Obesity and severe obesity forecasts through 2030. *Am J Prev Med*. 2012;42(6):563-70.
4. Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2019 revision. [internet] [Accessed July 20, 2019]. Available from: <http://www.ginasthma.org/>
5. World Health Organization. Asthma. [internet] [Accessed July 20, 2019]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma>
6. Kanneganti TD, Dixit VD. Immunological complications of obesity. *Nat Immunol*. 2012;13(8):707-712.
7. Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med*. 2012;18(3):363-374.
8. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med*. 2009;15(8):921-9.
9. Wolin KY, Carson K, Colditz GA. Obesity and cancer. *Oncologist*. 2010;15(6):556-565.
10. Khandekar MJ, Cohen P, Spiegelman BM. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(12):886-895.

11. Beuther DA, Sutherland ER. Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175(7):661-666.
12. Chen YC, Dong GH, Lin KC, Lee YL. Gender difference of childhood overweight and obesity in predicting the risk of incident asthma: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 2013;14(3):222-231.
13. Egan KB, Ettinger AS, Bracken MB. Childhood body mass index and subsequent physician-diagnosed asthma: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *BMC Pediatr.* 2013;13:121.
14. Camargo CA Jr, Weiss ST, Zhang S, Willett WC, Speizer FE. Prospective study of body mass index, weight change, and risk of adult-onset asthma in women. *Arch Intern Med.* 1999;159(21):2582-2588.
15. Castro-Rodríguez JA, Holberg CJ, Morgan WJ, Wright AL, Martinez FD. Increased incidence of asthmalike symptoms in girls who become overweight or obese during the school years. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(6):1344-1349.
16. Deng X, Ma J, Yuan Y, Zhang Z, Niu W. Association between overweight or obesity and the risk for childhood asthma and wheeze: An updated meta-analysis on 18 articles and 73 252 children. *Pediatr Obes.* 2019;14(9):e12532.
17. Diaz J, Farzan S. Clinical implications of the obese-asthma phenotypes. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014;34:739-51.
18. Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, Weiss ST, Renz H, Sly PD. Asthma. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15025.
19. Boonpiyathad T, Sözener ZC, Satitsuksanoa P, Akdis CA. Immunologic mechanisms in asthma. *Semin Immunol.* 2019;46:101333.
20. Holguin F, Bleecker ER, Busse WW, Calhoun WJ, Castro M, Erzurum SC, et al. Obesity and asthma: an association modified by age of asthma onset. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:1486-93.e2.

21. Chen L, Collado K, Rastogi D. Contribution of systemic and airway immune responses to pediatric obesity-related asthma. *Paediatr Respir Rev.* 2021;37:3-9.
22. Dixon AE, Poynter ME. Mechanisms of asthma in obesity. Pleiotropic aspects of obesity produce distinct asthma phenotypes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2016;54:601–8.
23. Peters U, Dixon AE, Forno E. Obesity and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141:1169-1179.
24. Umetsu DT. Mechanisms by which obesity impacts upon asthma. *Thorax.* 2017;72(2):174-177.
25. Ali Z, Ulrik CS. Obesity and asthma: a coincidence or a causal relationship? A systematic review. *Respir Med.* 2013;107(9):1287-300.
26. Rasmussen F, Hancox RJ. Mechanisms of obesity in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2014;14:35–43.
27. Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):738-749.
28. Chehimi M, Vidal H, Eljaafari A. Pathogenic Role of IL-17-Producing Immune Cells in Obesity, and Related Inflammatory Diseases. *J Clin Med.* 2017;6(7):68..
29. Fitzpatrick DR, Wilson CB. Methylation and demethylation in the regulation of genes, cells, and responses in the immune system. *Clin Immunol.* 2003;109(1):37-45.
30. Manna P, Jain SK. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab Syndr Relat Disord.* 2015;13(10):423-444.
31. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007;117(1):175-184.
32. Clària J, González-Pérez A, López-Vicario C, Rius B, Titos E. New insights into the role of macrophages in adipose tissue inflammation and Fatty liver disease: modulation by

- endogenous omega-3 Fatty Acid-derived lipid mediators. *Front Immunol.* 2011;2:49.
Published 2011 Oct 5. doi:10.3389/fimmu.2011.00049
33. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1796-1808.
 34. Periyalil HA, Wood LG, Wright TA, Karihaloo C, Starkey MR, Miu AS, et al. Obese asthmatics are characterized by altered adipose tissue macrophage activation. *Clin Exp Allergy.* 2018;48(6):641-649.
 35. Kim HY, Lee HJ, Chang YJ, Pichavant M, Shore SA, Fitzgerald KA, et al. Interleukin-17-producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity. *Nat Med.* 2014;20(1):54-61.
 36. Kudo M, Melton AC, Chen C, Engler MB, Huang KE, Ren X, et al. IL-17A produced by $\alpha\beta$ T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nat Med.* 2012;18(4):547-54.
 37. Leiria LO, Martins MA, Saad MJ. Obesity and asthma: beyond T(H)2 inflammation. *Metabolism.* 2015;64(2):172-181.
 38. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity.* 2019;50(4):892-906.
 39. Iwamoto S, Iwai S, Tsujiyama K, Kurahashi C, Takeshita K, Naoe M, et al. TNF-alpha drives human CD14+ monocytes to differentiate into CD70+ dendritic cells evoking Th1 and Th17 responses. *J Immunol.* 2007;179(3):1449-57.
 40. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature.* 2006;441(7090):231-4.

41. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24(2):179-189.
42. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*. 2007;448(7152):484-487.
43. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature*. 2008;454(7202):350-2.
44. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol*. 2007;8(9):967-74.
45. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485-517.
46. Hirahara K, Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Kanno Y, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(6):425-434.
47. Endo Y, Asou HK, Matsugae N, Hirahara K, Shinoda K, Tumes DJ, et al. Obesity Drives Th17 Cell Differentiation by Inducing the Lipid Metabolic Kinase, ACC1. *Cell Rep*. 2015;12(6):1042-55.
48. Wu Q, Nie J, Gao Y, Xu P, Sun Q, Yang J, et al. Reciprocal regulation of RORyt acetylation and function by p300 and HDAC1. *Sci Rep*. 2015;5:16355.
49. Endo Y, Yokote K, Nakayama T. The obesity-related pathology and Th17 cells. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(7):1231-1245.
50. Du J, Huang C, Zhou B, Ziegler SF. Isoform-specific inhibition of ROR alpha-mediated transcriptional activation by human FOXP3. *J Immunol*. 2008;180(7):4785-4792.

51. Leija-Martínez JJ, Huang F, Del-Río-Navarro BE, Sánchez-Muñoz F, Romero-Nava R, Muñoz-Hernández O, et al. Decreased methylation profiles in the TNFA gene promoters in type 1 macrophages and in the IL17A and RORC gene promoters in Th17 lymphocytes have a causal association with non-atopic asthma caused by obesity: A hypothesis. *Med Hypotheses*. 2020;134:109527.
52. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-33.
53. Unutmaz D. RORC2: the master of human Th17 cell programming. *Eur J Immunol*. 2009;39(6):1452-1455.
54. Aygun AD, Gungor S, Ustundag B, Gurgoze MK, Sen Y. Proinflammatory cytokines and leptin are increased in serum of prepubertal obese children. *Mediators Inflamm*. 2005;2005(3):180-183.
55. Shin JY, Kim SY, Jeung MJ, Eun SH, Woo CW, Yoon SY, et al. Serum adiponectin, C-reactive protein and TNF-alpha levels in obese Korean children. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2008;21(1):23-9.
56. Reinehr T, Stoffel-Wagner B, Roth CL, Andler W. High-sensitive C-reactive protein, tumor necrosis factor alpha, and cardiovascular risk factors before and after weight loss in obese children. *Metabolism*. 2005;54(9):1155-1161.
57. Bruun JM, Pedersen SB, Kristensen K, Richelsen B. Opposite regulation of interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha by weight loss. *Obes Res*. 2002;10(6):499-506.
58. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 1995;95(5):2409-2415.

59. Rastogi D, Fraser S, Oh J, Huber AM, Schulman Y, Bhagtani RH, et al. Inflammation, metabolic dysregulation, and pulmonary function among obese urban adolescents with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;191(2):149-60.
60. Rastogi D, Canfield SM, Andrade A, Isasi CR, Hall CB, Rubinstein A, et al. Obesity-associated asthma in children: a distinct entity. *Chest.* 2012;141(4):895-905.
61. Sumarac-Dumanovic M, Stevanovic D, Ljubic A, Jorga J, Simic M, Stamenkovic-Pejkovic D, et al. Increased activity of interleukin-23/interleukin-17 proinflammatory axis in obese women. *Int J Obes (Lond).* 2009;33(1):151-6.
62. Zapata-Gonzalez F, Auguet T, Aragonès G, Guiu-Jurado E, Berlanga A, Martinez S, et al. Interleukin-17A Gene Expression in Morbidly Obese Women. *Int J Mol Sci.* 2015;16(8):17469-17481.
63. Łuczyński W, Grubczak K, Moniuszko M, Głowińska-Olszewska B, Bossowski A. Elevated levels of Th17 cells in children with central obesity. *Scand J Clin Lab Invest.* 2015;75(7):595-601.
64. Schindler TI, Wagner JJ, Goedicke-Fritz S, Rogosch T, Coccejus V, Laudenbach V, et al. TH17 Cell Frequency in Peripheral Blood Is Elevated in Overweight Children without Chronic Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2017;8:1543.
65. Mathews JA, Wurmbbrand AP, Ribeiro L, Neto FL, Shore SA. Induction of IL-17A Precedes Development of Airway Hyperresponsiveness during Diet-Induced Obesity and Correlates with Complement Factor D. *Front Immunol.* 2014;5:440.
66. Marijsse GS, Seys SF, Schelpe AS, Dilissen E, Goeminne P, Dupont LJ, et al. Obese individuals with asthma preferentially have a high IL-5/IL-17A/IL-25 sputum inflammatory pattern. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;189(10):1284-1285.
67. Wu Y, Yue J, Wu J, Zhou W, Li D, Ding K, et al. Obesity May Provide Pro-ILC3 Development Inflammatory Environment in Asthmatic Children. *J Immunol Res.* 2018;2018:1628620.

68. Dias ASO, Santos ICL, Delphim L, Fernandes G, Endlich LR, Cafasso MOSD, et al. Serum leptin levels correlate negatively with the capacity of vitamin D to modulate the in vitro cytokines production by CD4+ T cells in asthmatic patients. *Clin Immunol.* 2019;205:93-105.
69. Levine SJ, Larivée P, Logun C, Angus CW, Ognibene FP, Shelhamer JH. Tumor necrosis factor- α induces mucin hypersecretion and MUC-2 gene expression by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;12(2):196-204.
70. Rubbia-Brandt L, Sappino AP, Gabbiani G. Locally applied GM-CSF induces the accumulation of α -smooth muscle actin containing myofibroblasts. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1991;60(2):73-82.
71. Paulsson Y, Austgulen R, Hofslie E, Heldin CH, Westermark B, Nissen-Meyer J. Tumor necrosis factor-induced expression of platelet-derived growth factor A-chain messenger RNA in fibroblasts. *Exp Cell Res.* 1989;180(2):490-496.
72. Palombella VJ, Mendelsohn J, Vilcek J. Mitogenic action of tumor necrosis factor in human fibroblasts: interaction with epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. *J Cell Physiol.* 1988;135(1):23-31.
73. Schwingshackl A, Duszyk M, Brown N, Moqbel R. Human eosinophils release matrix metalloproteinase-9 on stimulation with TNF- α . *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(5):983-989. doi:10.1016/s0091-6749(99)70079-5
74. Berry MA, Hargadon B, Shelley M, Parker D, Shaw DE, Green RH, et al. Evidence of a role of tumor necrosis factor α in refractory asthma. *N Engl J Med.* 2006;354(7):697-708.
75. Brown SD, Brown LA, Stephenson S, Dodds JC, Douglas SL, Qu H, et al. Fitzpatrick AM. Characterization of a high TNF- α phenotype in children with moderate-to-severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(6):1651-4.

76. Kunkel SL, Standiford T, Kasahara K, Strieter RM. Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung. *Exp Lung Res.* 1991;17(1):17-23.
77. Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest.* 2001;119(5):1329-1336.
78. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(5 Pt 1):1532-1539.
79. Moore WC, Hastie AT, Li X, Li H, Busse WW, Jarjour NN, et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(6):1557-63.e5.
80. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax.* 2002;57(10):875-879.
81. Sur S, Crotty TB, Kephart GM, Hyma BA, Colby TV, Reed CE, et al. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? *Am Rev Respir Dis.* 1993;148(3):713-9.
82. Lindén A. Interleukin-17 and airway remodelling. *Pulm Pharmacol Ther.* 2006;19(1):47-50.
83. Ricciardolo FLM, Sorbello V, Folino A, Gallo F, Massaglia GM, Favatà G, et al. Identification of IL-17F/frequent exacerbator endotype in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(2):395-406.
84. Aujla SJ, Alcorn JF. T(H)17 cells in asthma and inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1810(11):1066-1079.

85. Laan M, Lötvalld J, Chung KF, Lindén A. IL-17-induced cytokine release in human bronchial epithelial cells in vitro: role of mitogen-activated protein (MAP) kinases. *Br J Pharmacol.* 2001;133(1):200-206.
86. Bullens DM, Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Hellings PW, Dupont LJ, et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res.* 2006;7(1):135.
87. Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lötvalld J, Sjöstrand M, Gruenert DC, et al. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol.* 1999;162(4):2347-2352.
88. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol.* 1998;160(7):3513-3521.
89. Jones CE, Chan K. Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;26(6):748-753.
90. Agache I, Ciobanu C, Agache C, Anghel M. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma. *Respir Med.* 2010;104(8):1131-1137.
91. McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, Dupont RB, Kapadia S, Logar A, et al. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol.* 2008;181(6):4089-4097.
92. Chambers ES, Nanzer AM, Pfeffer PE, Richards DF, Timms PM, Martineau AR, et al. Distinct endotypes of steroid-resistant asthma characterized by IL-17A(high) and IFN-gamma(high) immunophenotypes: Potential benefits of calcitriol. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(3):628-637.e4.
93. Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet.* 2001;38(5):285-303

94. Attwood JT1, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Feb;59(2):241-57.
95. Mazzoni A, Santarasci V, Maggi L, Capone M, Rossi MC, Querci V, et al. Demethylation of the RORC2 and IL17A in human CD4+ T lymphocytes defines Th17 origin of nonclassic Th1 cells. *J Immunol.* 2015;194(7):3116-26.
96. Kwon NH, Kim JS, Lee JY, Oh MJ, Choi DC. DNA methylation and the expression of IL-4 and IFN-gamma promoter genes in patients with bronchial asthma. *J Clin Immunol.* 2008;28(2):139-46.
97. Peng C, Van Meel ER, Cardenas A, Rifas-Shiman SL, Sonawane AR, Glass KR, et al. Epigenome-wide association study reveals methylation pathways associated with childhood allergic sensitization. *Epigenetics.* 2019;14(5):445-466.
98. Yang IV, Pedersen BS, Liu A, O'Connor GT, Teach SJ, Kattan M, et al. DNA methylation and childhood asthma in the inner city. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(1):69-80.
99. Arathimos R, Suderman M, Sharp GC, Burrows K, Granell R, Tilling K, et al. Epigenome-wide association study of asthma and wheeze in childhood and adolescence. *Clin Epigenetics.* 2017; 9:112.
100. Nicodemus-Johnson J, Naughton KA, Sudi J, Hogarth K, Naurekas ET, Nicolae DL, et al. Genome-Wide Methylation Study Identifies an IL-13-induced Epigenetic Signature in Asthmatic Airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193(4):376-85.
101. Zhang H, Tong X, Holloway JW, Rezwani FI, Lockett GA, Patil V, et al. The interplay of DNA methylation over time with Th2 pathway genetic variants on asthma risk and temporal asthma transition. *Clin Epigenetics.* 2014;6(1):8.
102. Reese SE, Xu CJ, den Dekker HT, Lee MK, Sikdar S, Ruiz-Arenas C, et al. Epigenome-wide meta-analysis of DNA methylation and childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143(6):2062-2074.

103. Jones B, Chen J. Inhibition of IFN-gamma transcription by site-specific methylation during T helper cell development. *EMBO J.* 2006;25(11):2443-52.
104. Rastogi D, Suzuki M, Grealley JM. Differential epigenome-wide DNA methylation patterns in childhood obesity-associated asthma. *Sci Rep.* 2013; 3:2164.
105. Jeong A, Imboden M, Ghantous A, Novoloaca A, Carsin AE, Kogevinas M, et al. DNA Methylation in Inflammatory Pathways Modifies the Association between BMI and Adult-Onset Non-Atopic Asthma. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(4). pii: E600.
106. Kurdyukov S, Bullock M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology (Basel).* 2016;5(1). pii: E3.
107. Hoang TT, Sikdar S, Xu CJ, Lee MK, Cardwell J, Forno E, et al. Epigenome-wide association study of DNA methylation and adult asthma in the Agricultural Lung Health Study. *Eur Respir J.* 2020;56(3):2000217.
108. Johnson AA, Akman K, Calimport SR, Wuttke D, Stolzing A, de Magalhães JP. The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-related disease. *Rejuvenation Res.* 2012;15(5):483-494.
109. Encuesta Nacional de Salud y Nutricion 2018. [internet] [Accessed July 20, 2019]. Available _____ from: https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_preseleccion_resultados.pdf
110. Tashiro H, Shore SA. Obesity and severe asthma. *Allergol Int* 2019;68:135–42
111. Sze E, Bhalla A, Nair P. Mechanisms and therapeutic strategies for non-T2 asthma. *Allergy* 2019;00:1–15.
112. Yuan Y, Ran N1, Xiong L. Obesity-Related Asthma: Immune Regulation and Potential Targeted Therapies. *J Immunol Res.* 2018:1943497.
113. Kalchiem-Dekel O, Yao X, Levine SJ. Meeting the Challenge of Identifying New Treatments for Type 2-Low Neutrophilic Asthma. *Chest.* 2020;157(1):26-33.

114. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Guo SS, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Mei Z, et al. 2000 CDC Growth Charts for the United States: methods and development. *Vital Health Stat* 11. 2002;(246):1-190.
115. National Heart, Lung, and Blood Institute. Asthma Care Quick Reference: Diagnosing and Managing Asthma. [internet] [Accessed July 20, 2020]. Available from: <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/all-publications-and-resources/asthma-care-quick-reference-diagnosing-and-managing#:~:text=The%20purpose%20of%20the%20Asthma,term%20follow%20Dup%20to%20people>
116. Tanner JM. Growth at adolescence. Oxford, UK: Blackwell, 1962.
117. Sánchez-Villegas A, Martín-Calvo N, Martínez-González MA. Correlación y regresión lineal simple. En: Martínez-González MA. Bioestadística amigable 3.ª edición. Barcelona, España. Editorial Elsevier;2014. p. 269-324.
118. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013;310(20):2191-2194.
119. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 1993;15(3):532-537.
120. Hidalgo-Figueroa S, Navarrete-Vázquez G, Estrada-Soto S, Giles-Rivas D, Alarcón-Aguilar FJ, León-Rivera I, et al. Discovery of new dual PPAR γ -GPR40 agonists with robust antidiabetic activity: Design, synthesis and in combo drug evaluation. *Biomed Pharmacother*. 2017;90:53-61.
121. Giacomán-Martínez A, Alarcón-Aguilar FJ, Zamilpa A, Hidalgo-Figueroa S, Navarrete-Vázquez G, García-Macedo R, et al. Triterpenoids from *Hibiscus sabdariffa* L. with PPAR δ/γ Dual Agonist Action: In Vivo, In Vitro and In Silico Studies. *Planta Med*. 2019;85(5):412-423.

122. Cordero P, Campion J, Milagro FI, Goyenechea E, Steemburgo T, Javierre BM, et al. Leptin and TNF-alpha promoter methylation levels measured by MSP could predict the response to a low-calorie diet. *J Physiol Biochem*. 2011;67(3):463-70.
123. Lambrecht BN, Hammad H, Fahy JV. The Cytokines of Asthma. *Immunity*. 2019;50(4):975-991. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.018
124. Liu W, Liu S, Verma M, Zafar I, Good JT, Rollins D, et al. Mechanism of TH2/TH17-predominant and neutrophilic TH2/TH17-low subtypes of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(5):1548-1558.e4.
125. Burt Solorzano CM, McCartney CR. Obesity and the pubertal transition in girls and boys. *Reproduction*. 2010;140(3):399-410. doi:10.1530/REP-10-0119
126. Wadden D, Allwood Newhook LA, Twells L, Farrell J, Gao Z. Sex-Specific Association between Childhood BMI Trajectories and Asthma Phenotypes. *Int J Pediatr*. 2018;2018:9057435. Published 2018 Dec 2. doi:10.1155/2018/9057435
127. Del-Rio-Navarro BE, Castro-Rodriguez JA, Garibay Nieto N, Berber A, Toussaint G, Sienna-Monge JJ, et al. Higher metabolic syndrome in obese asthmatic compared to obese nonasthmatic adolescent males. *J Asthma*. 2010 Jun;47(5):501-6.
128. Sharma N, Akkoyunlu M, Rabin RL. Macrophages-common culprit in obesity and asthma. *Allergy*. 2018;73(6):1196-1205. doi:10.1111/all.13369
129. Deng J, Liu Y, Yang M, Wang S, Zhang M, Wang X, et al. Leptin exacerbates collagen-induced arthritis via enhancement of Th17 cell response. *Arthritis Rheum*. 2012;64(11):3564-73.
130. Lee SM, Choi HJ, Oh CH, Oh JW, Han JS. Leptin increases TNF- α expression and production through phospholipase D1 in Raw 264.7 cells. *PLoS One*. 2014;9(7):e102373. Published 2014 Jul 21.

131. Kasahara DI, Kim HY, Williams AS, Verbout NG, Tran J, Si H, et al. Pulmonary inflammation induced by subacute ozone is augmented in adiponectin-deficient mice: role of IL-17A. *J Immunol.* 2012;188(9):4558-67.
132. Yu Y, Liu Y, Shi FD, Zou H, Matarese G, La Cava A. Cutting edge: Leptin-induced ROR γ t expression in CD4⁺ T cells promotes Th17 responses in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2013;190(7):3054-3058. doi:10.4049/jimmunol.1203275
133. Wen Y, Zeng Q, Luo X, Ma R, Tang Y, Liu W. Leptin Promoted IL-17 Production from ILC2s in Allergic Rhinitis. *Mediators Inflamm.* 2020;2020:9248479. Published 2020 Sep 9. doi:10.1155/2020/9248479
134. Al-Ayed M, Alshaybari K, Alshehri D, Jamaan A, Nasser I, Alaamri H, et al. Obesity and childhood asthma in male schoolchildren in Saudi Arabia: Is there a role for leptin, interleukin-4, interleukin-5, and interleukin-21? *Ann Saudi Med.* 2019 Sep-Oct;39(5):295-301. doi: 10.5144/0256-4947.2019.295. Epub 2019 Oct 3. PMID: 31580718; PMCID: PMC6832322.
135. Garcia-Mayor RV, Andrade MA, Rios M, Lage M, Dieguez C, Casanueva FF. Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(9):2849-2855. doi:10.1210/jcem.82.9.4235
136. Nagel G, Koenig W, Rapp K, Wabitsch M, Zoellner I, Weiland SK. Associations of adipokines with asthma, rhinoconjunctivitis, and eczema in German schoolchildren. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009;20(1):81-88. doi:10.1111/j.1399-3038.2008.00740.x
137. Newson RB, Jones M, Forsberg B, Janson C, Bossios A, Dahlen SE, et al. The association of asthma, nasal allergies, and positive skin prick tests with obesity, leptin, and adiponectin. *Clin Exp Allergy.* 2014;44(2):250-60.
138. Blum WF, Englaro P, Hanitsch S, Juul A, Hertel NT, Müller J, et al. Plasma leptin levels in healthy children and adolescents: dependence on body mass index, body fat

mass, gender, pubertal stage, and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab.*
1997;82(9):2904-10.



ANEXOS

Anexo 1. Carta de consentimiento informado.

EXPRESION GÉNICA Y PERFIL DE METILACIÓN EN LOS PROMOTORES DE LOS GENES DE *TNFA*, *IL17A* y *RORC* EN LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA EN ADOLESCENTES CON ASMA ASOCIADA A LA OBESIDAD.

Número de Registro: HIM/2013/015.

Nombre del niño _____

Fecha _____

Nº Registro Hospital _____ Nº paciente del estudio _____

Tanto la obesidad como el asma son dos enfermedades muy frecuentes en nuestra población. Su asociación clínica es clara pero el mecanismo por el cual se produce aún no se conoce. Su estudio es muy importante, México es uno de los países con mayor obesidad en el mundo y queremos plantear soluciones a este grave problema de salud.

¿Por qué se está haciendo este estudio?

El propósito del estudio es medir en los adolescentes con asma y obesidad la cantidad de las sustancias que causan inflamación en los bronquios y en consecuencia los síntomas del asma como tos y silbido de pecho. Estas sustancias inflamatorias son llamadas citocinas y son producidas por sus células de las defensas llamados linfocitos T cooperadores y por la grasa del abdomen. Para los médicos es importante saber qué tipo de sustancias inflamatorias están más elevadas que otras para poder clasificar mejor el tipo de asma su hijo.

El objetivo del estudio es explorar cómo se comportan estas citocinas y relacionarlas con el estado genético correspondiente, es decir analizar los genes de estas sustancias en los diferentes tipos de pacientes con asma y obesidad. Es decir, se van a medir directamente en el suero y en las células de su sangre para evaluar si en los adolescentes con asma y



obesidad producen más sustancias inflamatorias a diferencia de los otros grupos de adolescentes que son sanos o que únicamente tienen asma o solo padecen obesidad.

¿Qué cosas le van a hacer a mi hijo(a)? Si usted y su hijo (a) están de acuerdo en participar en el estudio, manifestando por escrito con la firma de este documento y del asentimiento del menor de edad, se les pedirá que asistan a una sola cita, en ayuno por la mañana, para que se le tome una muestra de sangre (10 mililitros) que servirá para medir las sustancias de inflamación.

Se les preguntará sobre sus antecedentes médicos y se le practicará una detallada exploración física, además de la toma de los valores como peso, talla, presión arterial y frecuencia cardíaca.

Asimismo, el material biológico una vez que se procese será resguardado para futuros estudios, previamente con su debida autorización con el fin de fomentar el conocimiento encausado en líneas de investigación de obesidad y asma.

¿Existe algún riesgo para mi hijo(a)?

Durante la toma de muestra de sangre su hijo pudiera sentir algo de dolor o molestia ocasionados por la aguja, a veces llega a formarse un pequeño moretón en el sitio de la punción. Muy ocasionalmente se presentan pequeñas hemorragias en el sitio por el que penetra la aguja y es mucho más raro que el paciente sufra una reacción de desmayo. En caso de que se presente cualquiera de las molestias ya comentadas, el personal médico que en todo momento que acompaña a los pacientes está capacitado para tratar y revertir estos efectos adversos.

¿Qué beneficios obtengo por participar en este estudio?

A su hijo(a) se le va a realizar una valoración nutricional completa, además de estudios de laboratorio que incluyen sustancias inflamatorias en la sangre. Uno beneficio importante es que los médicos van a clasificar mejor su tipo de asma y por lo tanto le van a poder ofrecer un mejor tratamiento. Todos estos estudios serán gratuitos.



Es muy importante aclarar que NO SE LE REALIZARA NINGUN PAGO en efectivo o en especie por participar en nuestro estudio. Así mismo, los registros de participación en este estudio serán mantenidos en una forma de estricta confidencialidad y de seguridad.

Usted no está obligado, bajo ninguna condición, a participar en el estudio. Si este es el caso, simplemente indíquelo al personal y se le seguirá atendiendo de la forma habitual.

Entiendo que yo _____ autorizo que mi hijo(a) participe voluntariamente en el estudio y que puedo retirarlo(a) en cualquier momento sin perjuicio o pérdida de cualquier beneficio, al que tenemos derecho.

Cualquier pregunta que yo tenga relacionada con algún aspecto de este estudio o con mis derechos como persona en investigación, será contestada por la Dra. Blanca Estela Del Rio Navarro (Méd. Alergólogo, Jefa del Área de Alergia e Investigadora Suplente al 52289917 ext. 2150.

_____ - - / - - / - - - - -

Nombre y firma del paciente fecha: dd/mm/aaaa

_____ - - / - - / - - - - -

Nombre y firma del padre o tutor fecha: dd/mm/aaaa

_____ - - / - - / - - - - -

Nombre y firma del Investigador fecha: dd/mm/aaaa



_____ - / - / - - - -

Nombre y firma del testigo 1 fecha: dd/mm/aaaa

Dirección: _____

Relación con el paciente: _____

_____ - / - / - - - -

Nombre y firma del testigo 2 fecha: dd/mm/aaaa

Dirección: _____

Relación con el paciente: _____



Anexo 2. Carta de asentimiento informado.

EXPRESION GÉNICA Y PERFIL DE METILACIÓN EN LOS PROMOTORES DE LOS GENES DE *TNFA*, *IL17A* y *RORC* EN LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA EN ADOLESCENTES CON ASMA ASOCIADA A LA OBESIDAD.

Número de Registro: HIM/2013/015.

Nombre del niño _____

Fecha _____

N° Registro Hospital _____ N° paciente del estudio _____

Tanto la obesidad como el asma son dos enfermedades muy frecuentes entre ustedes los jóvenes, es clara esta relación, sin embargo, necesitamos estudiarla a fondo para poder entender su comportamiento y proponer soluciones al problema.

¿Por qué se está haciendo este estudio?

El propósito del estudio es medirte la cantidad de las sustancias que causan inflamación en los bronquios y en consecuencia los síntomas del asma como tos y silbido de pecho. Estas sustancias inflamatorias son llamadas citocinas y son producidas por sus células de las defensas llamados linfocitos T cooperadores y por la grasa del abdomen. Para los médicos es importante saber qué tipo de sustancias inflamatorias están más elevadas que otras para poder clasificar mejor el tipo de tu asma.

Es decir, se van a medir directamente en el suero y en las células de tu sangre para evaluar si en los adolescentes con asma y obesidad producen más sustancias inflamatorias a diferencia de los otros grupos de adolescentes que son sanos o que únicamente tienen asma o solo padecen obesidad.

¿Qué procedimientos se me realizarán?

Se te pedirá que asistas a una sola cita, en ayunas, para tomarte una muestra de sangre (10 mililitros) para que podamos medir las sustancias de la inflamación.



Preguntaremos por tus datos generales para una historia clínica, antecedentes personales de enfermedad, mediremos tu peso, talla, presión arterial, frecuencia cardíaca.

¿Qué me puede pasar?

Durante la toma de muestra de sangre pudieras sentir algo de dolor o molestia ocasionada por la aguja en tu vena, y a veces llega a formarse un pequeño moretón en el sitio de la inserción. Rara vez llega a ocurrir una pequeña hemorragia en el sitio por el que penetra la aguja en la vena.

¿Qué beneficios obtengo por participar en este estudio?

Si decides participar, de manera voluntaria, la consulta médica y todos los estudios que te realicemos serán gratis. Los médicos al conocer cuáles son las sustancias inflamatorias más importantes en tu organismo podrán clasificar mejor tu asma y ofrecerte un mejor tratamiento. Es muy importante decirte que NO te daremos ningún estímulo económico o de otro tipo. Así mismo, los registros de participación en este estudio serán mantenidos en una forma de estricta confidencialidad y de seguridad.

NO estas obligado a participar, bajo ninguna condición. Si en algún momento decides no hacerlo, antes de iniciar o durante el procedimiento, solo indícalo al personal. Esto no te causara ningún reproche o sanción alguna.

Entiendo que yo _____ estoy participando voluntariamente en el estudio. Que puedo retirarme en cualquier momento sin perjuicio o pérdida de cualquier beneficio y cualquier pregunta que yo tenga relacionada con algún aspecto de este estudio o con mis derechos como persona en investigación, será contestado por la Dra. Blanca Estela Del Rio Navarro (Méd. Alergólogo, Jefa del Área de Alergia e Investigadora Suplente al 52289917 ext. 2150.

_____ - / - / - - - -

Nombre y firma del paciente fecha: dd/mm/aaaa



_____ - / - / - - - -

Nombre y firma del padre o tutor fecha: dd/mm/aaaa

_____ - / - / - - - -

Nombre y firma del Investigador fecha: dd/mm/aaaa

_____ - / - / - - - -

Nombre y firma del testigo 1 fecha: dd/mm/aaaa

Dirección: _____

Relación con el paciente: _____

_____ - / - / - - - -

Nombre y firma del testigo 2 fecha: dd/mm/aaaa

Dirección: _____

Relación con el paciente: _____



Anexo 3. Historia clínica.

EXPRESION GÉNICA Y PERFIL DE METILACIÓN EN LOS PROMOTORES DE LOS GENES DE *TNFA*, *IL17A* y *RORC* EN LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA EN ADOLESCENTES CON ASMA ASOCIADA A LA OBESIDAD.

Número de Registro: HIM/2013/015.

Nombre: _____

Fecha _____

Nº Registro Hospital _____ Nº paciente del estudio _____

Fecha de Nacimiento: _____

Edad: _____ años _____ meses. Sexo: Masculino () Femenino ().

Datos para establecer comunicación:

Dirección: _____

Teléfono casa: _____ Teléfono celular: _____

Teléfono trabajo: _____ Teléfono familiar o vecino _____

Correos electrónicos: _____

Antecedentes Heredofamiliares:

Madre:

Edad: _____ años. Obesidad: SI () NO ().

Si la respuesta es SI escriba el tiempo en de padecer obesidad: años _____, meses _____.

Asma SI () NO ().

Si la respuesta es SI escriba el tiempo en de padecer asma: años _____, meses _____.



Padre:

Edad: _____ años. Obesidad: SI () NO ().

Si la respuesta es SI escriba el tiempo en de padecer obesidad: años_____,
meses_____.

Asma SI () NO ().

Si la respuesta es SI escriba el tiempo en de padecer asma: años_____, meses_____.

Hermano 1.

Edad: _____ años. Obesidad: SI () NO ().

Si la respuesta es SI escriba el tiempo en de padecer obesidad: años_____,
meses_____.

Asma SI () NO ().

Si la respuesta es SI escriba el tiempo en de padecer asma: años_____, meses_____.

Hermano 2.

Edad: _____ años. Obesidad: SI () NO ().

Si la respuesta es SI escriba el tiempo en de padecer obesidad: años_____,
meses_____.

Asma SI () NO ().

Si la respuesta es SI escriba el tiempo en de padecer asma: años_____, meses_____.

Hermano 3.

Edad: _____ años. Obesidad: SI () NO ().

Si la respuesta es SI escriba el tiempo en de padecer obesidad: años_____,
meses_____.

Asma SI () NO ().



Si la respuesta es SI escriba el tiempo en de padecer asma: años_____, meses_____.

***** Si el paciente cuenta con mayor número de hermanos, favor de escribir los mismos datos al reverso de la hoja. Gracias. *****

Antecedentes Personales Patológicos:

En caso de que el paciente no sea asmático favor de escribir NA (No Aplica) en el espacio.

Tabaquismo (pasivo/activo) SI () NO ().

No Asmático: () Asmático: ().

Estadio de Tanner: Grado I () Grado II () Grado III () Grado IV () Grado V ()

Tiempo de evolución de tener obesidad: años_____ meses_____.

Grado de Obesidad: No mórbida () Mórbida ()

En caso de ser paciente asmático favor de contestar las siguientes preguntas:

Tiempo de evolución de tener asma: años_____ meses_____.

Gravedad del Asma: Asma Leve Persistente ().

Asma Moderada Persistente ().

Asma Grave Persistente ().

Control del Asma: Controlada (), Parcialmente controlada (), No controlada ().

Actualmente se encuentra con esteroides inhalados para controlar el asma: SI () NO ().

En caso afirmativo mencionar el nombre: _____

En caso afirmativo mencionar el tiempo: menos de 3 meses (), 3-6 meses (), 6-12 meses (), mayor a 12 meses ()



Actualmente toma algún antileucotrieno para controlar el asma: SI () NO ().

En caso afirmativo mencionar el nombre: _____

En caso afirmativo mencionar el tiempo: menos de 3 meses (), 3-6 meses (), 6-12 meses (), mayor a 12 meses ()

Exploración física:

Peso: _____ kg. Talla: _____ cm. IMC: _____ kg/m²

Perímetro abdominal: _____ cm. Cintura: _____ cm.

Cadera: _____ cm.

FC: _____ x' TA: _____.