



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
SECRETARIA DE SALUD
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**PARTICIPACIÓN DEL TLR9 Y DE LA IL-5 EN EL PROCESO
INFLAMATORIO DE PACIENTES ASMÁTICOS-OBESOS
ATENDIDOS EN EL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ**

T E S I S

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

PRESENTA:
DR. RODOLFO MURIEL VIZCAINO

Tutor: Dra. María del Carmen Maldonado Bernal

MÉXICO D.F., Febrero del 2014





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
SECRETARIA DE SALUD
ANTECEDENTES HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO GOMEZ

**PARTICIPACIÓN DEL TLR9 Y DE LA IL-5 EN EL PROCESO INFLAMATORIO DE
PACIENTES ASMÁTICOS-OBESOS ATENDIDOS EN EL HOSPITAL INFANTIL DE
MÉXICO**

**TRABAJO FINAL QUE PRESENTA
DR. RODOLFO MURIEL VIZCAINO**

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

Dr. Rebeca Gomezchico
Directora de Enseñanza y Desarrollo Académico
Hospital Infantil de México Federico Gómez



Dra. María del Carmen Maldonado Bernal
Investigadora en Ciencias Médicas C
Hospital Infantil de México Federico Gómez



Dra. Blanca Estela Del Río Navarro
Jefe de Departamento de Alergología e Inmunología Clínica Pediátrica
Hospital Infantil de México Federico Gómez

MÉXICO D.F., Febrero del 2014

MARCO TEORICO.....	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
PREGUNTA DE INVESTIGACION.....	11
JUSTIFICACIÓN.....	12
OBJETIVOS.....	13
MATERIAL Y METODOS.....	14
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN.....	28
CONCLUSIONES.....	31
CRONOGRAMA.....	32
REFERENCIAS.....	33
LIMITANTES DEL ESTUDIO	38
ANEXOS.....	39

Participación del TLR9 y de la IL-5 en el proceso inflamatorio de pacientes asmáticos-obesos atendidos en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

ANTECEDENTES

El papel concreto de los TLRs en la fisiopatología del asma no se conoce aún, se sabe por modelos murinos que la activación del TL2 se asocia con incremento de la hiperreactividad e inflamación de la vía aérea [1]. Sin embargo otros estudios mostraron que los ligandos de TLR2 y TLR4 pueden disminuir la respuesta alérgica [2].

En un estudio reciente Pacheco-Martinez y colaboradores, analizaron la expresión del receptor TLR4 en 4 grupos distintos de niños de la ciudad de México, los cuatro grupos fueron: pacientes asmáticos-obesos, asmáticos no obesos y obesos sin asma (de la consulta del Hospital Infantil de México Federico Gómez), así como voluntarios sanos. Reportaron una mayor expresión de este receptor en el grupo de pacientes asmáticos, en comparación con los otros 3 grupos, lo cual podría explicar su mayor reactividad a los alérgenos, entre ellos el LPS. Sin embargo, el grupo de obesos presentó menor expresión que los otros tres grupos y el grupo de obesos-asmáticos no presentó diferencia con los sanos, lo cual pudiera hablar de un equilibrio en la expresión del TLR4, determinada por las dos patologías[3].

En cuanto al TLR9 se sabe que los ligandos de este receptor (oligonucleótidos con secuencias CpG no metiladas) son capaces de prevenir y revertir la inflamación eosinofílica de la vía aérea inducida por antígenos en modelos animales de asma [4]. Modelos preclínicos de asma han demostrado que los ligandos del TLR-9 puede reducir los niveles circulantes de de IgE, así como la hiperreactividad bronquial. En modelos con exposición crónica a alérgenos, los oligonucleótidos con secuencias CpG no metiladas, fueron efectivos también para prevenir la remodelación de la vía aérea [5]. También han reportado que los ligandos de TLR9 pueden revertir los síntomas de asma cuando se usan solos o en combinación con terapia de desensibilización [6, 7]. En estos y otros estudios han observado que la activación del TLR9 promueve un perfil de inflamación de tipo Th1. Sin embargo no se cree que el perfil de citocinas sea indispensable para el beneficio terapéutico en los modelos preclínicos de asma atópica [8].

Mansson A y Cardell LO, encontraron que los oligonucleótidos con secuencias CpG no metiladas de las bacterias, induce la liberación de neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN). Así mismo, los eosinófilos activados por CpG, promueve la muerte de las células epiteliales respiratorias y la liberación de citocinas. Al estimular con mediadores alérgicos: histamina, IL-4, y principalmente IL-5, aumentó la secreción de IL-8 y la NDE, revelando una capacidad de sensibilizar a los eosinófilos para la activación por TLR7 y TLR9. También observaron que: la respuesta a los TLRs de los eosinófilos fue mayor en alérgicos, manifestada por un aumento de la IL-8 y la liberación de EDN, en comparación con sujetos sanos. Encontraron que los sujetos alérgicos muestran un nivel elevado en suero de IL-5. Este estudio muestra que la activación a través de TLR7 y TLR9 afecta varias funciones del eosinófilo y que el estado atópico del donador y la presencia de citocinas de tipo Th2, puede afectar el desenlace de la respuesta [9]. Así, la activación de eosinófilos a través del TLR7 y TLR9 podría generar un vínculo entre la infección viral y las exacerbaciones alérgicas.

Se piensa que las respuestas exageradas mediadas por linfocitos Th2, están relacionados con el desarrollo de asma. [10]. La dosis del antígeno que estimula el TLR determina el tipo de respuesta del linfocito T. Dosis bajas de LPS [11, 12, 13], o dosis bajas de ARN de doble cadena (dsRNA) [14], o infección por virus sincicial respiratorio [15] o dosis bajas de *C. pneumoniae* [16], inducen una respuesta Th2, con producción de eosinófilos y de IgE, mientras que con dosis altas de LPS [11, 12, 13], dosis altas de dsRNA [14] o dosis altas de *C. pneumoniae* [16], se genera una respuesta Th1. El estímulo en presencia de alérgenos puede generar sensibilización alérgica y el desarrollo futuro de asma. [11, 12, 17]. En la hipótesis de la higiene se refleja solo una parte de estos conceptos, el estímulo de los TLRs por LPS, previene el desarrollo de atopia, [17, 18, 19]; sin embargo, como lo mencionamos, la magnitud del estímulo y los factores que rodean esta reacción, determinarán el tipo de respuesta del linfocito T [20].

Se ha demostrado que el asma y la obesidad comparten el estado de inflamación crónica, algunos autores agregan el término de inflamación de bajo grado, algunas vías de señalización como la del TNF- α en común [21], sin embargo el aumento del tejido adiposo presente en la obesidad y el aumento de distintas adipocinas como la leptina, favorece una respuesta inmune adaptativa de tipo Th1 [22] al contrario de la Th2 que sabemos predomina en el asma. Ya desde hace algunos años se ha empezado a estudiar al asma

y la obesidad como una entidad [23-25], sin embargo se conoce poco del estado del sistema inmune innato de los pacientes asmáticos y asmáticos obesos en el mundo y en nuestro país.

MARCO TEÓRICO

Asma

El asma es una enfermedad crónica compleja y multifactorial, que generalmente se define por sus características clínicas, que si bien no son exclusivas de esta enfermedad, si están presentes en todos los pacientes que la padecen; como lo son: obstrucción variable del flujo aéreo que característicamente es reversible (responde al tratamiento con broncodilatadores), hiperreactividad bronquial, que es una broncoconstricción exagerada en respuesta a distintos estímulos mediada por mecanismos inmunes y una neuroregulación alterados. Desde el punto de vista celular, se caracteriza por el infiltrado de mastocitos, monocitos, linfocitos y eosinófilos; células que liberan sustancias pro-inflamatorias, ocasionando hipersecreción de moco, contracción y alteración del músculo liso bronquial [26,27], conduciendo finalmente a una remodelación pulmonar [28].

Existen datos clínicos que nos obligan a sospechar en la presencia de la enfermedad, como lo son: sibilancias, disnea, sensación de ahogo u opresión torácica, tos persistente (de predominio nocturno o matutino, que característicamente se exacerba con el ejercicio, la risa o el llanto intensos) dificultad respiratoria; síntomas que característicamente son recurrentes. La iniciativa global para el asma (GINA) [27] la define como “una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas en la cual múltiples células y productos celulares juegan un papel importante. Esta inflamación crónica produce un incremento en la respuesta de la vía aérea y episodios recurrentes de sibilancias, dificultad a la respiración, tiraje intercostal, tos y opresión torácica, especialmente en la noche y en la mañana. Estos episodios se asocian con obstrucción al flujo aéreo variable, reversible espontáneamente o con tratamiento”. Existe una definición funcional elaborada por Black en el 2002 [29] que también es muy utilizada, la cual se refiere al asma como: “la enfermedad pulmonar obstructiva crónica más frecuente en la niñez, que se caracteriza por hiperreactividad, inflamación de la vía aérea y reversibilidad en grado variable. Múltiples células se han implicado en la fisiopatología como linfocitos, células cebadas, basófilos y eosinófilos. En personas susceptibles esta inflamación causa limitación del

flujo aéreo y episodios repetidos de tos, sibilancias y dificultad respiratoria causados por broncoconstricción, edema, secreción de moco y en algunos pacientes remodelación de la vía aérea”.

Se estima que más de 300 millones de personas la padecen y se estima que para el 2025 serán 400 millones de asmáticos en el mundo [30], en las últimas décadas se ha observado un incremento importante en la prevalencia de la enfermedad [27, 31]. Mediante el estudio Internacional de Asma y Alergia en la infancia (siglas en inglés ISAAC) [32], se ha podido estandarizar un método para conocer la prevalencia de síntomas de asma, rinitis y conjuntivitis, así como comparar su frecuencia en distintos países. En el último reporte del 2009, la prevalencia de escolares que refirieron haber tenido alguna vez asma fue de 5.1 (norte y este de Europa) a 22% (Oceanía), 21.7% en el grupo de adolescentes y de 3.4% (África) a 29.2 % (Oceanía) en escolares. América del Norte es de las regiones con mayor frecuencia, reportando como media 20% en escolares y 17.3% en adolescentes [33]. Sin embargo, en México es del orden de 8 y 8.7 respectivamente [34].

La mortalidad no es despreciable, tomando en cuenta que debieran ser muertes prevenibles, la tasa en nuestro país es de 14.5 muertes por cada 100 mil pacientes que la padecen, aproximadamente 570 muertes al año, una de las más altas de América [30]. Cabe mencionar que la afección emocional y la limitación física – funcional es importante, modificando el estilo de vida de los pacientes que tienen asma no controlada, sin que se tenga un registro preciso de ello.

Asma y respuesta inmune

Su fisiopatología es compleja, aún no se comprende del todo, lo cierto es que es una enfermedad multifactorial. Se conocen varios factores que favorecen su desarrollo, como la atopia (predisposición genética para desarrollar una reacción de hipersensibilidad), seguido de otros como la exposición al humo de tabaco, al ozono, al diesel y a otras partículas libres [35, 36], la obesidad [37], las infecciones por virus o la exposición a ciertos microorganismos [26-28].

Uno de los grandes retos del sistema inmune (SI) es el de discernir entre moléculas extrañas, potencialmente dañinas y las moléculas propias. Su mal funcionamiento en este

sentido es la causa de las enfermedades autoinmunes y alérgicas. Es la interacción de la respuesta inmune innata y la adaptativa la que media la respuesta inflamatoria en el asma [38]. El sistema inmune innato está presente en todos los seres vivos y filogenéticamente es más antiguo que el adaptativo, se caracteriza por responder de forma inmediata (segundos a minutos), es menos específico y no posee memoria inmunológica. Sin embargo, cuenta con una gran variedad de receptores que son conocidos como “receptores de reconocimiento patrones (PRRs)” que le permiten diferenciar lo propio de lo ajeno. El sistema inmune adaptativo en cambio, es específico y posee memoria, sin embargo la respuesta es más lenta y requiere de una primera exposición (presentación de antígeno) para montar una respuesta. Para su estudio se divide en celular y humoral [39]. Existe evidencia de que alteraciones en la composición o funcionamiento del sistema inmune están estrechamente relacionadas con el desarrollo del asma [28].

El tracto respiratorio es un gran medio de exposición al medio ambiente y por lo tanto a millones de partículas y microorganismos, para lo que está cubierto por un epitelio cilíndrico simple ciliado con células productoras de moco, que sirven como barrera fisiológica [40]. En el cual abundan las células dendríticas (DC), que se encargan de la vigilancia inmunológica [41, 42], capturan, procesan y presentan antígenos a los linfocitos T a través del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHCII), uniéndose al receptor de células T (TCR), [43, 44] lo que genera una cascada de señalización intracelular que normalmente culmina en la producción de mediadores pro-inflamatorios y moléculas estimuladoras de linfocitos T y B, eosinófilos y monocitos [28].

La respuesta inmune es más compleja que esto, no solo existe el TCR y el MHCII, la llamada sinapsis inmunológica, que es esta compleja interacción entre la célula presentadora de antígeno y el linfocito efector, dependen de otros receptores y correceptores, además de la interacción de varias citocinas. Dependiendo del microambiente que rodee esta sinapsis inmunológica, se induce una respuesta que podrá estar encaminada a distintas vías, como lo es la respuesta Th1 (linfocito cooperador tipo I) o la Th2 (linfocito cooperador tipo II). La primera generalmente se activa ante la presencia de agentes infecciosos intracelulares del tipo viral y/o bacteriano, o situaciones de estrés, produciéndose interferón gamma (INF- γ), interleucina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que estimulan la activación y migración de monocitos y polimorfonucleares [11, 28, 45]. La segunda se relaciona sobre todo, con las

enfermedades alérgicas e infecciones por helmintos [28, 40], produciéndose IL-4, IL-5 e IL-13, encargadas de activar y diferenciar al linfocito B, estimulándolo para que cambie de isotipo y produzca IgE específica, así como de activar y atraer a los eosinófilos [40]. Una vez que la IgE se produce, se une a receptores de alta y baja afinidad, que se localizan con mayor frecuencia en la membrana de mastocitos y basófilos, encargados de generar la respuesta alérgica inmediata, al exponerse al antígeno específico para el cual fueron creados. In útero y hasta el nacimiento, la madre y el producto tienen un perfil Th2 predominante, indispensable para que se lleve a buen término la gestación, evitando el rechazo de la madre. Sin embargo, al nacimiento todos generamos una respuesta Th1, al exponernos al ambiente y a los microorganismos, favoreciéndose la maduración del sistema inmune. Sin embargo, en los pacientes atópicos la respuesta inmune está alterada, predominando el perfil Th2, conduciendo al estado inflamatorio crónico que caracteriza al asma y al resto de enfermedades alérgicas.

Respuesta inmune innata y asma

El sistema inmune innato es el más antiguo filogenéticamente hablando, por mucho tiempo se le ha restado importancia ya que se creía primitivo. Sin embargo, es el primero en interactuar con los distintos patógenos, a diferencia del adaptativo no requiere de la exposición previa a las moléculas para ser activado y responde en cuestión de minutos. Las células del sistema inmune innato poseen un sistema de detección de moléculas constituyentes no variables de los patógenos llamados “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs) y de ligandos endógenos productos del daño celular denominados “patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)”, este sistema de detección es a través de receptores llamados “receptores de reconocimiento patron” (PRRs), localizados principalmente en la superficie celular, iniciando y modulando la respuesta inmune, que de acuerdo al agresor mejor convenga para destruirlo y reparar el daño. Adicionalmente, este sistema es el iniciador y modulador de la respuesta inmune adaptativa [46].

Actualmente se han descrito tres familias de PRRs: los receptores tipo-Toll (TLRs), los receptores tipo-NOD (NLR) [NOD- dominio de oligomerización unido a nucleótidos] y los receptores tipo-RIG (RLR) [RIG- gen del ácido retinoico inducible] [40, 47]. Los TLRs fueron los primeros en describirse y hasta ahora son los más estudiados, tienen su origen evolutivo en las plantas [48]. Deben su nombre a la proteína Toll de la mosca *Drosophila*, con la que comparten similitudes estructurales, cuya función inmunológica es defensa en

contra de hongos y bacterias Gram positivas [48, 49]. Mediante estudios en células humanas se identificó una proteína con homología a la descrita en la mosca y se denominó TLR4, originalmente se demostró que reconoce al LPS de E. coli y que induce la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B), el cual induce la expresión de genes inflamatorios y de moléculas coestimuladoras, necesarias para la presentación de antígenos al linfocito T “naive” [50].

A la fecha se han descrito 11 TLRs en humanos, de los cuales 10 son funcionales [51]. Los TLRs al reconocer a sus PAMPs o DAMPs, activan las vías de señalización de factores de transcripción, entre ellos: NF- κ B, factores reguladores de interferón (IRF) y/o activador de proteína-1 (AP-1), para finalmente inducir la producción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, quimiocinas, IFNs tipo I, moléculas coestimuladoras y otros factores de la respuesta efectora [52].

Los TLRs se expresan principalmente en la superficie de múltiples células que pueden estar implicadas en la patogénesis del asma, incluyendo monocitos, células dendríticas, natural killer, células T, NK, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos, células epiteliales y del músculo liso de la vía aérea, sin embargo a la fecha no se han estudiado en esta patología. Se sabe que los TLRs están involucrados en la fisiopatología del asma, principalmente TLR2, TLR4, TLR7 y TLR9, estos receptores representan un vínculo importante entre la respuesta innata y la adaptativa [17, 37, 53].

El TLR9 reconoce y es activado por nucleótidos de ADN no metilados (presentes en virus, hongos y bacterias) conocidos como motivos CpG no metilados, se encuentra expresado en la superficie de las células e intracelularmente en los endosomas. Su activación, al igual que la de los otros TLRs, resulta en la activación de genes involucrados en proinflamación y en la producción de interferones de tipo 1 e IL-12 principalmente [51], citocinas que predominan en la respuesta inmune adaptativa de tipo Th1, la cual no predomina en las patologías alérgicas como el asma [28].

Asma y Obesidad

La obesidad infantil es considerada por la Organización Mundial de la Salud, al igual que por las autoridades sanitarias de nuestro país, como uno de los problemas de salud pública más importantes en la actualidad.

La obesidad desde el punto de vista conceptual se define como el exceso de grasa corporal, secundario a un desequilibrio entre la ingesta energética y el gasto energético. En niños y adolescentes la clasificación se debe realizar de acuerdo a las referencias de los Centros de Prevención y Control de Enfermedades, por sus siglas en inglés CDC (Centers for Disease Control and Prevention), las cuales son específicas para la edad y sexo. De acuerdo a esta clasificación, actualmente se considera un índice de masa corporal (Kg/m^2) normal si se encuentra entre la percentil >5 y <85 ; sobrepeso entre percentil 85-95 y obesidad con percentil igual o mayor a 95 [54].

La obesidad se encuentra entre las principales patologías de los adolescentes. En conjunto el sobrepeso y la obesidad en este grupo es de cerca del 30% [55]. Su prevalencia se ha incrementado a más del doble en los últimos 20 años, sin mostrar signos de disminución epidemiológica y llama la atención que en la población infantil es donde se ha presentado el mayor porcentaje de incremento, al igual que las comorbilidades y complicaciones [56]. Entre ellas se encuentran los problemas cardiovasculares, metabólicos y respiratorios.

En México, la encuesta nacional de salud del año 2012 determinó que la prevalencia de obesidad en el grupo de escolares entre 6 y 11 años de edad fue del 11.8% en las niñas y 17.4% en los niños; para el grupo de adolescentes (12 a 19 años) fue del 12.1% en mujeres y del 14.5% en hombres. Si se toma en cuenta el área metropolitana, la obesidad y el sobrepeso incrementan las cifras a 28% en hombres y 30.1% en mujeres [57].

La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de asma, agrava su sintomatología y empeora su evolución. En la última década ha crecido la evidencia de esta interrelación. Los pacientes asmáticos que presentan sobrepeso, cursan con una evolución más grave de ésta [58, 59]. Existen diversos factores que los asocian, como lo son los factores mecánicos que genera la obesidad sobre el funcionamiento y empeoramiento de la mecánica pulmonar. Estudios longitudinales indican que el riesgo relativo de prevalencia de asma es directamente proporcional al incremento de la obesidad [60, 61].

Cada vez hay más evidencias de que la obesidad es un estado "proinflamatorio". Los estudios iniciales demostraron que existe una asociación entre obesidad y diversos marcadores inflamatorios, como el factor de necrosis tumoral ($\text{TNF-}\alpha$), las interleucinas, tales como la IL-6 y la IL- 1β además de la proteína C reactiva [22, 62]. Se ha demostrado que la IL-6 y el $\text{TNF-}\alpha$ se expresan en los adipocitos y se relacionan directamente con la

grasa corporal total [21]. Por otra parte, el TNF- α también está aumentado en el asma y está relacionado con la producción de IL-4 e IL-5 y de IL-6 e IL-1 β por el epitelio bronquial [28, 38, 40]. Por lo expuesto, puede inferirse que la vía inflamatoria del TNF- α sería la vía común tanto para la obesidad como para el asma.

La leptina, una proteína codificada por el gen *Lep*, es una hormona producida por los adipocitos, que actúa sobre el hipotálamo en el centro de la saciedad y del estímulo del metabolismo basal. La concentración circulante de leptina se ha relacionado positivamente con la grasa corporal [22, 62]. Además, se ha demostrado que también cumple una importante función en la estimulación de la liberación de citocinas pro-inflamatorias como la IL-6 y el TNF- α por el adipocito [63]. La leptina promueve asimismo, la respuesta inmune de tipo Th1, con una mayor secreción de proteínas como el interferón gamma (IFN- γ) [64]. También se ha descrito que existe una relación entre valores elevados de leptina y de IFN- γ ya que la leptina incrementa la expresión y secreción del IFN- γ de las células periféricas mononucleares. Por otra parte, se ha demostrado que en estados de hipoleptinemia hay una reducción de la inmunidad celular en ratones [65, 66] y del TNF- α en humanos [67].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El asma es una enfermedad crónica, caracterizada por un estado inflamatorio persistente. Afecta a millones de personas en el mundo y su incidencia ha aumentado en las últimas décadas. A pesar de que no es una enfermedad nueva, hay reportes de síntomas respiratorios sugestivos antes de nuestra era y el término fue acuñado desde Hipócrates, hasta ahora, ha sido difícil entender sus mecanismos fisiopatológicos. En la década de los 80's, se explicaba por la afección de músculo liso y el broncoespasmo; en los 90's, se describieron varias alteraciones en la respuesta inflamatoria y sus diferentes vías. Sin embargo cada día se conocen con más detalle los mecanismos e interacciones del sistema inmune innato y adaptativo que pudieran estar involucrados en la fisiopatogenia del asma.

Actualmente los esfuerzos están dirigidos en encontrar las alteraciones a nivel celular, sabemos que el asma es resultado de un desbalance entre la respuesta Th1 y Th2, predominando la segunda, asociado a la producción aumentada de IL-4, IL-5, IL-13, y por lo tanto aumento en el cambio de isotipo a IgE; con disminución en la concentración de IL-2 e INF- γ .

Se ha demostrado que la ausencia o mal funcionamiento de los receptores tipo-Toll, principalmente TLR2, TLR4, TLR7 y TLR9, favorecen la expresión del perfil Th2, predisponiendo la aparición del asma, también han observado que el estímulo con distintos ligandos de TLRs, los más estudiados TLR2, TLR4, TLR7 y TLR9, en modelos murinos de asma, modifica la respuesta inmune y por lo tanto podría disminuir la respuesta inflamatoria alérgica. Sin embargo, no se conoce si la expresión TLR9 está alterada en los pacientes asmáticos y como está afectada esa expresión con la obesidad.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿El estado de inflamación persistente en los escolares asmáticos-obesos, modifica la expresión del TLR9 de las células mononucleares, la producción de IL-5 y el perfil Th1/Th2 de citocinas?

JUSTIFICACION

El asma es una enfermedad inflamatoria persistente, en donde los receptores tipo-Toll pueden dirigir la respuesta hacia Th1 o Th2; por lo que es necesario contar con más evidencias fundamentadas en estudios en humanos, con modelos de inflamación, que cuenten con la rigidez metodológica adecuada, para conocer cuál es el nivel de expresión del TLR9 y las citocinas Th2, principalmente IL-5, en pacientes con asma y su efecto por la obesidad.

OBJETIVO GENERAL

Describir si la inflamación persistente modifica la expresión del TLR9, de las células mononucleares y conocer su asociación con la producción de IL-5 y el perfil Th1/Th2 de citocinas, en un grupo de escolares asmáticos-obesos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar la expresión del TLR 9 en escolares de 6 a 13 años, obesos-asmáticos, obesos sin asma, asmáticos no obesos y sanos.
2. Determinar la asociación de la expresión del TLR9 con los niveles séricos de IL-5 en el asma y en la obesidad, así como en la coexistencia de estas enfermedades.
3. Determinar la asociación de la expresión del TLR9 con la respuesta de citocinas inflamatorias en el asma.
4. Determinar la asociación de la expresión del TLR9 con la respuesta de citocinas inflamatorias en la obesidad.
5. Determinar si la expresión del TLR9 en células mononucleares se presenta de manera diferente en la respuesta inflamatoria por asma y por obesidad.
6. Demostrar si existen cambios en el perfil de citocinas Th1 o Th2 en el asma y en la obesidad y si se asocian con alteraciones en la expresión del TLR9.

HIPOTESIS

Las células mononucleares de los asmáticos-obesos tendrán incrementada la expresión del TLR9, dirigiendo la respuesta del linfocito T hacia Th1.. La cantidad de IL-5 encontrada en el grupo de obesos-asmáticos será menor comparada con el grupo de asmáticos no obesos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño.

Se trata de un estudio transversal, analítico, descriptivo, en un grupo de pacientes escolares asmáticos con obesidad, que acuden de manera regular al servicio de alergia e inmunología y a la clínica de obesidad, del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Criterios de inclusión Pacientes:

- Escolares de 6 a 13 años de edad.
- Ambos géneros.
- Que tengan el diagnóstico médico de asma o síntomas sugestivos como tos, disnea y sibilancias de 3 meses de evolución o por lo menos 2 episodios de broncoespasmo en los últimos 12 meses.
- Asma alérgica intermitente o leve persistente.
- Pruebas cutáneas positivas para uno o más aeroalergenos.
- Que tenga obesidad.
- Que tengan diferente patología a las mencionadas.
- Que desee participar en el estudio y firme en el asentimiento.
- Que los padres estén de acuerdo y firmen el consentimiento informado.

Criterios de inclusión Controles

Controles sanos:

- Escolares de 6 a 13 años de edad.
- Ambos géneros.
- Sin patología respiratoria.
- Sin enfermedades concomitantes.
- Que no cursen con ningún cuadro infeccioso durante la toma de la muestra del estudio y por lo menos siete días previos.
- Que tenga un peso adecuado para su edad.

Controles con asma sin obesidad:

- Escolares de 6 a 13 años de edad.
- Ambos géneros.

- Que tengan el diagnóstico médico de asma o síntomas sugestivos como tos, disnea y sibilancias de 3 meses de evolución o por lo menos 2 episodios de broncoespasmo en los últimos 12 meses.
- Asma alérgica intermitente o leve persistente.
- Sin enfermedades concomitantes.
- Que no cursen con ningún cuadro infeccioso durante la toma de la muestra del estudio y por lo menos siete días previos.
- Que tenga un peso adecuado para su edad.

Controles obesos sin asma:

- Escolares de 6 a 13 años de edad.
- Ambos géneros.
- Sin patología respiratoria.
- Sin enfermedades concomitantes.
- Que no cursen con ningún cuadro infeccioso durante la toma de la muestra del estudio y por lo menos siete días previos.
- Que tenga obesidad.

Criterios de no inclusión:

- Alteraciones del sistema inmune, enfermedades reumáticas, crónico degenerativas o trastornos del metabolismo diferentes a obesidad.
- Que curse con un proceso infeccioso en los últimos siete días previos a su ingreso.
- Que hayan utilizando esteroides sistémicos o tópicos en las últimas 8 semanas.
- Que no acepte participar en el estudio.
- Los padres no desean firmar el consentimiento informado.
- Obesidad mórbida.
- Asma moderada descontrolada o grave persistente.

Criterios de exclusión:

- Retiro del consentimiento.
- Que no desee participar en el estudio.
- Que no acuda a su cita.
- Embarazo.

DEFINICIÓN DE VARIABLES

Variables independientes

Obesidad.

Definición, es el exceso de grasa corporal.

Tipo de variable escalar.

Escala de medición índice de masa corporal.

Unidad de medida, unidad expresada en kg/m^2 .

Cuando el IMC es mayor o igual a la percentil 95 para su edad, se considera al sujeto obeso. En IMC se calcula dividiendo el peso en kilogramos, entre la talla en metros al cuadrado (peso/talla²).

El peso mide la masa, se realiza en una balanza de pie y palanca, marca "Health o meter" modelo 402 KL, que se calibra de manera constante, que permite una lectura mínima de 100 g. El paciente debe pesarse en ropa ligera, sin zapatos, de pie, los mismos días de la semana y con una diferencia de +/- una hora.

La talla mide el tamaño de los segmentos. La medición se realiza con un estadímetro "Holtain Limited Crymych", Dyfec (Gran Bretaña), anotando en centímetros (cm) el resultado. El sujeto debe estar descalzo sobre una superficie plana, haciendo ángulo recto con la barra vertical del estadímetro. La cabeza debe estar posicionada en el plano Frankfurt horizontal, (viendo directamente hacia el frente, con el borde orbitario inferior en el mismo plano que el conducto auditivo externo). Los brazos deben colgar libremente, las manos deben colocarse sobre la parte lateral externa del muslo. Los talones deben estar juntos; con los bordes internos medios de los pies se formará un ángulo de 60°. Finalmente, se pide al sujeto que inhale antes de deslizar la cabecera sobre el máximo punto superior de la cabeza del paciente.

Asma.

Definición, enfermedad inflamatoria crónica de la vía aérea, caracterizada por hiperreactividad y obstrucción del flujo aéreo, regularmente reversible, manifestada por tos, sibilancias y disnea.

Tipo de variable cualitativa.

Escala de medición intermitente, leve, moderada y grave.

Unidad de medida intermitente o persistente.

El diagnóstico y clasificación de asma se hace en base a las guías internacionales GINA (iniciativa global para asma).

Variables dependientes

Toll-like receptor

Definición. Receptor de membrana celular que reconoce los patrones moleculares asociados a patógenos. Es uno de los responsables del inicio de la respuesta inmune innata, caracterizada por el incremento de los niveles séricos de TNF- α e IL-1 β .

Tipo de variable escalar.

Escala de medición numérica,

Se obtiene una muestra sanguínea de 8 ml y se coloca en un tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), como anticoagulante. Posteriormente se separan las células mononucleares por gradiente con Ficoll-Hypaque. Se preparan laminillas con 2 spots c/u con 10,000 células, se deja secar a temperatura ambiente (evitar que se seque por completo). Se fijan las células con formaldehído al 4 % durante 20 min a 4°C, sumergiendo las laminillas completamente. Se lava con PBS 1X durante 5 min en agitación, deja secar y conserva en lugar fresco hasta la realización de la tinción. Se prepara el Baño María a 92°C. Se coloca en un vaso de coupling citrato de sodio 0.01M, pH 6 y se pone en el baño María a que alcance los 92°C, se colocan las laminillas y se dejan por 20 minutos a 92°C. Se hacen 3 lavados con PBS de 5 min c/u a 130 RPM. Se prepara metanol/agua oxigenada (27 ml/3 ml) y se agrega al vaso de coupling por 15 min a 130 RPM (2 veces). Se lava con agua destilada por 5 min a 135 RPM. Después se lava con PBS por 5 min a 135 RPM. Se sacan las laminillas, se secan y se delimita el área de las células con marcador hidrofóbico. Se bloquea con suero de cerdo al 2% durante 2 horas en cámara húmeda y en agitación. Se coloca 30 μ L del primer anticuerpo a la concentración requerida e incubar durante toda la noche en cámara húmeda y en agitación. Se realizan 5 lavados con PBS c/u de 8 min a 135 rpm. Se coloca una gota del

segundo anticuerpo-Biotinylated link universal y se incuba durante 30 min en cámara húmeda y en agitación. Se realizar 3 lavados con PBS c/u de 5 min a 135 rpm. Posteriormente se coloca una gota de estreptavidin peroxidase-HRP (por 30 min en cámara húmeda y en agitación) y se realizan 3 lavados con PBS de 5 min a 135 rpm. Se revela con diaminobencidina (DAB) y finalmente se lee la intensidad de color en un microscopio óptico.

Interleucinas

Definición. Son proteínas solubles de bajo peso molecular mediadoras de diversas funciones biológicas entre las que se encuentran: proliferación celular, inflamación, diferenciación y reparación celular. Producidas por diversas estirpes celulares, son el principal medio de comunicación intracelular, definen la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune.

Tipo de variable, escalar.

Escala de medición, unidades.

Unidad de medición, picogramos/mililitro.

Las determinaciones de interleucinas se harán a través de ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) disponibles comercialmente. Los procedimientos se llevarán a cabo de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Pharmingen).

El método consiste en lo siguiente, 100 μ l del plasma del paciente se colocan en los pozos de la placa de ELISA, recubiertos previamente con el anticuerpo de la interleucina a buscar. Después de incubar los sueros por 3 horas, se lavan los pocillos 4 veces y se adicionan los anticuerpos específicos y un conjugado de peroxidasa.

Después de otra incubación y lavados, se adicionó el sustrato de la enzima que será transformado en un producto colorido, medible por espectrofotometría.

En el estudio se correrán las siguientes interleucinas para todos los pacientes: IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5.

IgE específica para aeroalérgenos

Definición. Anticuerpo específico contra aeroalérgenos ambientales, que son desencadenantes del asma alérgica.

Tipo de variable escalar.

Escala de medición, positivo o negativo.

Unidad de medida. Milímetros.

Procedimiento

- 1.- Se coloca al paciente en posición cómoda, procurando que la superficie de la espalda, descubierta, quede en forma recta y con una buena fuente de luz natural. Se realiza asepsia de la región dorsal con torundas de algodón impregnadas con alcohol.
- 2.- Se marca por medio de puntos en la región dorsal utilizando un arcador de punta fina para indicar la zona en donde será aplicado cada uno de los alérgenos de pruebas, diferenciándolos de los controles negativo y positivo, procurando hacerlo de forma ordenada de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. Hay que evitar las zonas extremas de la espalda, es decir, la zona del cuello y lumbosacra.
- 3.- Se aplica una gota de cada alérgeno estandarizado en solución glicerinada con ayuda de un capilar por encima de cada punto, en forma ordenada y al final en la marca del control negativo, glicerina al 50% y en el positivo fosfato de histamina [0.1mg/ml] en solución glicerinada.
- 4.- Se realiza una lesión cutánea por escarificación, con una lanceta de punto mediano, sobre cada uno de los alérgenos dispuestos. Disponiendo una lanceta para los controles y una para los reactivos, limpiando con una torunda con alcohol y una seca, entre cada de estos.
- 5.- Se toma un tiempo de lectura de 25 minutos, durante este tiempo el paciente permanecerá dentro del laboratorio, en compañía de su familiar. No debe tocarse o rascarse la espalda. Para evitar alterar los resultados.
- 6.- Una vez transcurrido el tiempo indicado se limpia la zona con una gasa, de manera sutil y evitando frotar la piel. Posteriormente se leen los resultados, con un vernier. Se

obtiene el valor promedio en milímetros, sumando el diámetro mayor con el menor y dividiéndolo entre dos. Se considera positivo cuando las pápulas son 3mm mayores al control. Cuando el tamaño de la pápula es del doble de la histamina se considera un resultado muy reactivo.

El reporte se anota en la libreta de resultados del laboratorio.

PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se estimarán medidas descriptivas para identificar a la población estudiada, para contrastar la hipótesis, la prueba elegida es ANOVA, el intervalo de confianza establecido es de 95%, considerando significativo cualquier valor de $p < 0.05$. Estimaremos riesgos de asociación.

Los datos se analizarán en el programa Windows SPSS versión 12.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

No existe beneficio terapéutico para estos adolescentes y como no hay maniobra terapéutica el riesgo para ellos es mínimo, sólo la molestia de la venopunción; se solicitará autorización por escrito tanto del padre como del paciente. Se anexan las cartas de consentimiento y asentimiento informado.

RESULTADOS

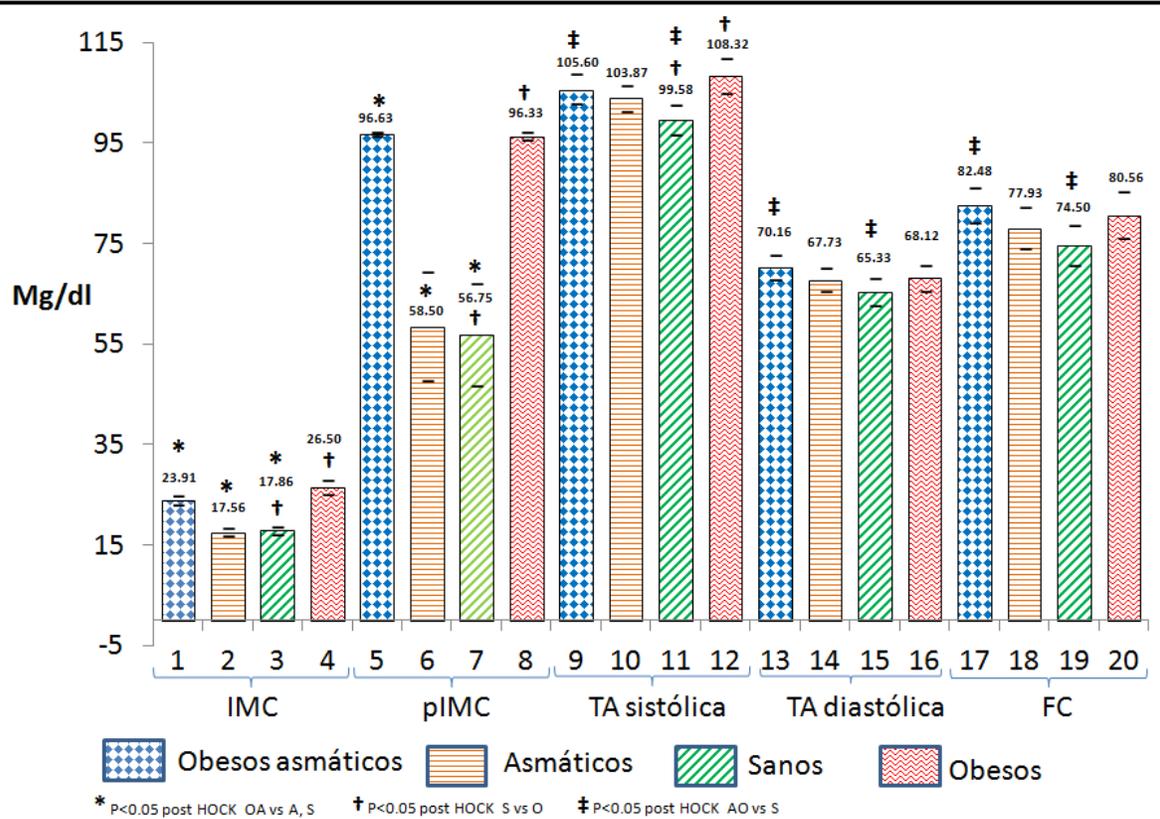
Características de los sujetos estudiados

Se incluyeron 25 pacientes de cada grupo de estudio. De los 27 pacientes obesos sin asma (O) que se habían reclutado originalmente, 2 no accedieron a la toma de sangre por lo que fueron excluidos, también ocurrió con 3 de los 28 voluntarios sanos, por lo que tampoco fueron incluidos. Todos los pacientes asmáticos que fueron incluidos en el estudio, tanto los obesos como los eutróficos, mostraban un fenotipo de asma leve y ninguno presentaba exacerbación o síntomas agudos al momento de ser incluidos en el estudio, ni al momento de la toma de la muestra de sangre.

En el grupo de obesos-asmáticos el promedio de índice de masa corporal (IMC) fue de 23.9 kg/m² (IC95%: 22.9-24.9), con un promedio de percentil del IMC de 96.6% (IC95%: 96.2-97.1) con diferencia estadísticamente significativa ($P<0.05$) en comparación con el grupo de los asmáticos-eutróficos y los voluntarios sanos, sin ser así para el grupo de los obesos sin asma; lo que habla de la validez de los grupos del estudio.

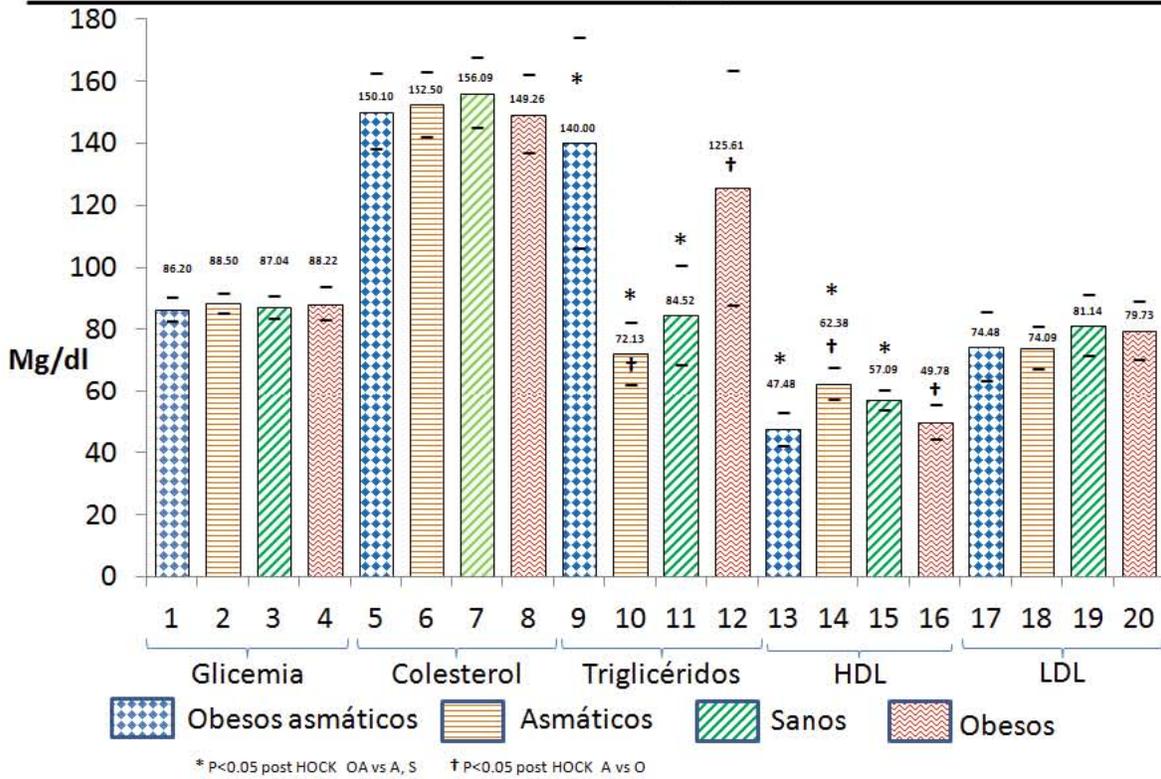
Con respecto a los signos vitales, se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P<0.05$) tanto en la presión sistólica como en la diastólica, de 6 mm Hg y 4.8 mm Hg, respectivamente entre los obesos-asmáticos y los voluntarios sanos. Así como una diferencia de 8.7 mm Hg en la presión sistólica de los obesos sin asma en comparación con los voluntarios sanos ($P<0.05$). El promedio de la frecuencia cardiaca en los obesos-asmáticos fue de 82.5 latidos por minuto contra 74.5 latidos por minuto en los voluntarios sanos ($P<0.05$) (Gráfica 1).

Gráfica 1. Comparación de los valores medios e IC95 de antropometría y Sig. Vit. en cuatro grupos de adolescentes



En lo que al perfil metabólico respecta se observaron niveles significativamente mayores de triglicéridos en el grupo de obesos-asmáticos con un promedio de 140.0 mg/dL (IC95%: 106.1 - 173.9) contra 72.1 mm/dL y 84.5 mg/dL como promedio en el grupo de asmáticos-eutróficos y de voluntarios sanos respectivamente (P<0.05), también se encontró una diferencia estadísticamente significativa (P<0.05) entre el grupo de obesos sin asma y el de los asmáticos eutróficos con un valor promedio de triglicéridos de 125.6 mg/dl (IC95%: 87.9-163.3) y 72.1 mg/dl (IC95%: 62.0-88.2) respectivamente. El nivel de HDL fue menor en el grupo de obesos-asmáticos, con un promedio de 47.5 mg/dL (IC95%: 42.1-52.8), con una diferencia de +14.9 mg/dL comparado con los asmáticos-eutróficos y de +9.6 mg/dL en comparación con los sanos. (Gráfica 2).

Gráfica 2. Comparación de los valores medios e IC95 del perfil metabólico en cuatro grupos de adolescentes



En la tabla 1 que aparece a continuación se muestran los promedios y los intervalos de confianza del 95% de los valores antropométricos y metabólicos del estudio.

Tabla 1. Valores Antropométricos y metabólicos de los grupos de estudio

Variable	Obesos-asmáticos (OA)		Asmáticos (A)		Sanos (S)		Obesos (O)		
	Prom.	IC 95%	Prom.	IC 95%	Prom.	IC 95%	Prom.	IC 95%	
Edad (años)	8.2	7.5-8.9	9.2	8.5-9.9	10.1	9.4-10.8	10.0	9.4-10.7	
Peso (kg)	42.2	38.0-46.3	32.9	29.8-36.0	36.4	32.2-40.6	57.3	51.5-63.2	*, †
Talla (cm)	132.3	127.7-136.8	135.6	131.6-139.7	141.3	135.7-146.8	145.9	141.5-150.3	
IMC (kg/m ²)	23.9	23.0-24.9	17.6	16.7-18.4	17.9	17.1-18.6	26.5	25.0-28.0	*, †
pIMC	96.6	96.2-97.1	58.5	47.8-69.3	56.8	46.6-66.9	96.3	95.5-97.2	*, †
TA Sistólica (mmHg)	105.6	102.6-108.6	103.9	101.3-106.5	99.6	96.7-102.5	108.3	104.8-111.8	†, ‡
TA Diast. (mmHg)	70.2	67.7-72.6	67.7	65.4-70.1	65.3	62.6-68.0	68.1	65.5-70.7	‡
FC (bpm)	82.5	79.0-86.0	77.9	73.8-82.1	74.5	70.5-78.5	80.6	75.9-85.2	‡
Glucosa (mg/dl)	86.2	82.4-90.0	88.5	85.3-91.7	87.0	83.5-90.6	88.2	83.0-93.4	
TG (mg/dl)	140.0	106.1-173.9	72.1	62.0-82.2	84.5	68.5-100.5	125.6	87.9-163.3	*, †
HDL (mg/dl)	47.5	42.1-52.8	62.4	57.2-67.6	57.1	53.7-60.5	49.8	44.4-55.2	*, †
LDL (mg/dl)	74.5	63.2-85.7	74.1	67.2-80.9	81.1	71.4-90.9	79.7	70.4-89.1	
Insulina (mg/dl)	11.4	7.8-15.1	5.6	3.9-7.4	6.4	4.8-8.0	12.6	9.8-15.4	*, †, ‡

* P<0.05 post HOCK OA vs A † P<0.05 post HOCK A vs O ‡ P<0.05 post HOCK HV vs O

Producción de citocinas

Las cantidades detectadas de IL-2 e IFN- γ fueron menores en el grupo de obesos-asmáticos en comparación con los otros tres grupos, el valor sérico promedio de la IL-2 en este grupo fue de 42.18 [error estándar (ES) \pm 14.9], encontrando diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) en comparación con los sanos (172.4;ES \pm 15.9), los obesos (161.6;ES \pm 15.3) y los asmáticos-eutróficos (50.5;ES \pm 11.4). También encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) entre el grupo de asmáticos-eutróficos y los obesos sin asma y los sanos (Figura 1A).

De los 4 grupos estudiados, fue en el de los obesos-asmáticos en el que se detectaron niveles séricos menores de $\text{INF-}\gamma$, con un promedio de 4.24 ($\text{ES}\pm 1.3$), seguido por el grupo de asmáticos con un promedio de 12.97 ($\text{ES}\pm 7.4$), ambos con diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo de sanos, con un promedio de niveles séricos de 25.74 ($\text{ES}\pm 7.8$); no encontrando diferencia significativa entre obesos-asmáticos y asmáticos-eutróficos (Figura 1B).

Figura 1 A

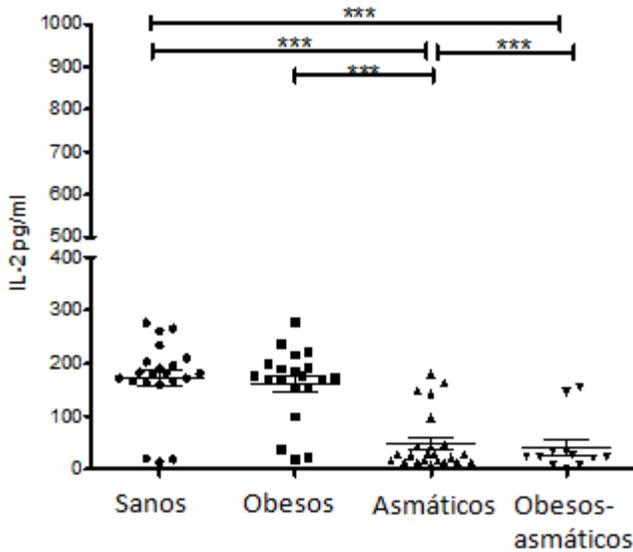
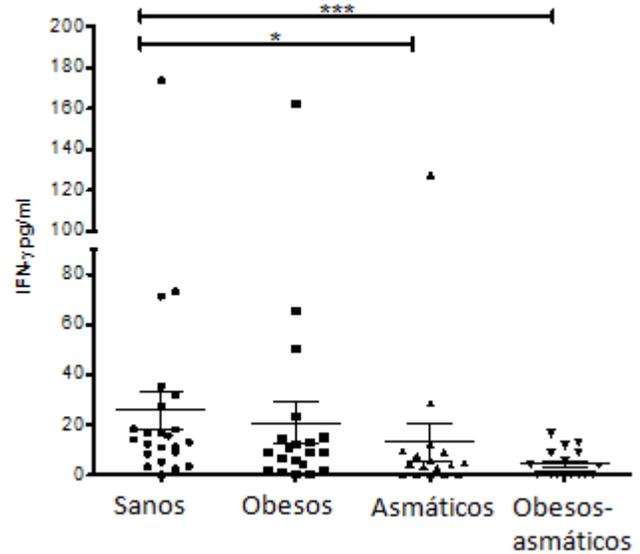


Figura 1B

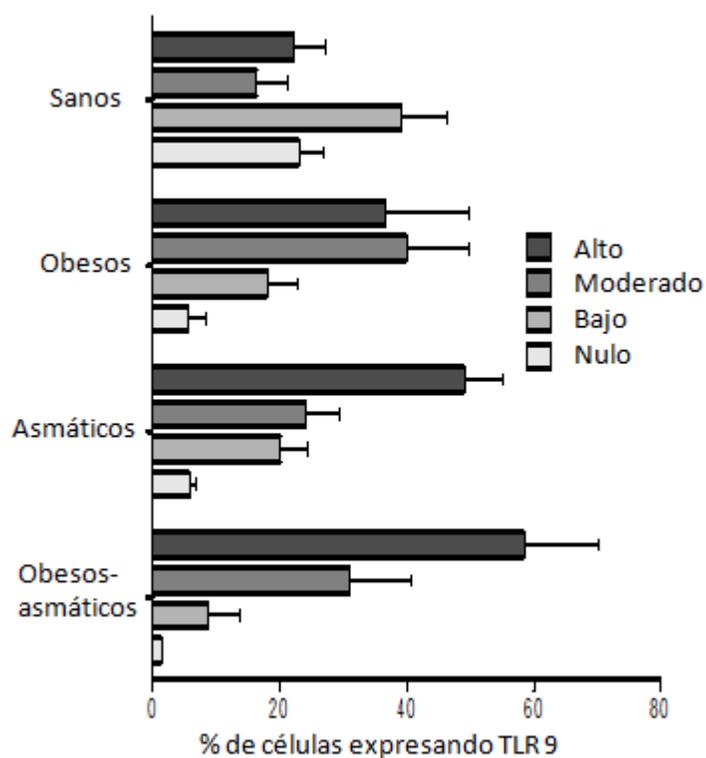


El promedio de la cantidad de IL-4 que se encontró en el suero de los pacientes obesos-asmáticos fue casi igual al promedio de los pacientes asmáticos-eutróficos, con un valor de 112.4 ($\text{ES}\pm 30.3$) y 107.7 ($\text{ES}\pm 23.4$) respectivamente. Los niveles de IL-4 en estos dos grupos fueron ligeramente mayores a comparación de los otros dos grupos, obesos sin asma y sanos, pero sin diferencia significativa ($p=0.23$) (Figura 1C). En cuanto a la IL-10, los niveles séricos detectados en todos los grupos en general fueron bajos, se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) entre los asmáticos-eutróficos, con un promedio de 14.9 ($\text{ES}\pm 11.7$) y el grupo de los voluntarios sanos en el que el promedio fue de 0.32 ($\text{ES}\pm 0.3$) (Figura 1D).

nula en el 9% de las células. En el grupo de los obesos-asmáticos se observó la mayor expresión de TLR9 en comparación con los otros 3 grupos del estudio, se encontró una alta expresión en el 59% de las células, una expresión moderada en el 31%, baja en el 9% y solamente 1% de las células no expresaron el receptor (Figura 2).

Se encontró que la mediana de la expresión del TLR9 en las células mononucleares de los pacientes obesos-asmáticos fue significativamente mayor que en el grupo de los sanos y mayor que cualquier otro grupo. Con el análisis de Kruskal-Wallis de la varianza, también resultó que el grupo de obesos-asmáticos expreso mayores niveles de TLR9 en comparación con los sanos. El grupo de asmáticos-eutróficos y el de los obesos sin asma también presentaron mayor expresión de TLR9 en comparación con los sanos con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$). También analizamos la diferencia en la expresión de TLR9 entre los grupos usando la prueba post hoc de Dunn, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de obesos-asmáticos y asmáticos-eutróficos ($p < 0.05$).

Figura 2. Expresión de TLR 9



DISCUSIÓN

El crecimiento del tejido adiposo normal y el incremento de su función en los sujetos obesos conduce a un estado proinflamatorio sistémico, regulando hacia la alza de numerosas citocinas, sus fracciones solubles y sus receptores. Se sabe que el tejido adiposo es capaz de sintetizar varios mediadores como: IL-6, IL-10, eotaxina, factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), factor de crecimiento transformante-beta1 (TGF- β 1), proteína C-reactiva (PCR), leptina y adiponectina, conocidas como adipocinas [68, 69].

Encontramos que los niveles de IL-2 (citocina Th1) fueron menores en los pacientes obesos-asmáticos en comparación al resto de los grupos, así como en el grupo de los asmáticos-eutróficos también presentó menores cantidades en comparación de los obesos y los sanos. Esto confirma lo ya descrito en el asma, condición en la que existe una respuesta inmune Th1 disminuida, lo que inclina la balanza de la respuesta hacia Th2. Se sabe que la IL-2 aumenta la proliferación de las células T y la expresión de FoxP3, lo que también llevaría al aumento de las células T reguladoras [70]. Estudios anteriores sugieren que la presencia de inflamación crónica, como ocurre en el asma y en la obesidad, disminuye el número y la función de las células T reguladoras. En un estudio de Luczynski y colaboradores reportan en 25 niños con síndrome metabólico, disminución en el número de células T reguladoras en comparación con los controles, diferencia que no se observó cuando las células fueron estimuladas con IL-2 [70, 71]. Siendo esto uno de los factores que contribuyen a la inflamación crónica persistente de bajo grado y a la falta de regulación que afecta a los pacientes obesos-asmáticos.

El INF- γ es una de las citocinas más representativas de la respuesta inmune de tipo Th1, se ha asociado con los estados de inflamación crónica que prevalecen en la obesidad y el síndrome metabólico y se piensa que está involucrado en la vía de la leptina, ya que en estos pacientes estos mediadores incrementan a la par [72]. Nosotros observamos que los pacientes obesos-asmáticos y los asmáticos-eutróficos presentaron menores niveles de INF- γ comparado con los sanos y los obesos sin asma, lo cual era esperado ya que se sabe que el fenotipo en el asma es predominantemente Th2. Otras citocinas que caracterizan a un perfil proinflamatorio son el TNF- α y la IL-1 β , se ha documentado que el TNF- α está presente en el tejido adiposo y que sus niveles se relacionan con la cantidad de grasa corporal. Altas concentraciones de TNF- α en el asma se relacionan con la aumentada producción de citocinas Th2 (IL-4 e IL-6) en el epitelio bronquial y por lo tanto

en el incremento de los niveles plasmáticos [68, 69]. Sin embargo, no detectamos niveles elevados de TNF- α o de IL-1 β , creemos que esto se debió a la gran inestabilidad de estas citocinas.

Se encontró una tendencia a mayores niveles de IL-4 en los obesos-asmáticos y en los asmáticos-eutróficos, en comparación con los obesos y los sanos como podría esperarse por efecto del asma. La IL-10, una de las principales citocinas anti-inflamatoria tiene un rol fundamental en la regulación de la respuesta inmune [73]. En los pacientes que estudiamos, los asmáticos-eutróficos mostraron una mayor producción de IL-10 en comparación con los sanos. Con respecto a los pacientes obesos-asmáticos, otros autores han estudiado la participación de la IL-10 en estos pacientes y no han encontrado correlación entre los niveles de esta interleucina y el grado de obesidad o inflamación, el papel de la IL-10 es complejo y aún no ha sido completamente elucidado, hablando en particular de estas patologías [73, 74].

La producción de citocinas se da como consecuencia de la activación de los receptores del sistema inmune innato, es por esto que también estudiamos la expresión del TLR9. La detección por inmunohistoquímica del TLR9 demostró un patrón de predominio nuclear, la intensidad y el porcentaje de expresión fue mayor en el grupo de los obesos-asmáticos. Se sabe que la activación del TLR9 induce predominantemente una respuesta de tipo Th1 en el epitelio broquial, sin embargo no de forma exclusiva [75]. No sabemos si su función o el estímulo que lo desencadena es el mismo en la sangre periférica o si depende del ambiente en el que se encuentra para estimular o inclinar la respuesta inmune hacia uno u otro lado de la balanza Th1/Th2. Es interesante observar que en el grupo de obesos-asmáticos, seguido por el de asmáticos-eutróficos, haya mayor expresión de TLR9, grupos en los que predomina una respuesta de tipo Th2. La estimulación del TLR9 promueve la activación de las células natural killer (NK), induce la maduración de las células presentadoras de antígenos, favoreciendo una respuesta Th1 y estimulando la proliferación antígeno independiente de las células B [76]. Un estudio multicéntrico reciente reportó relación entre la mutación del gen del TLR9 con la presencia de sibilancias [75], lo que indica su importante participación. Por otro lado, se sabe que la estimulación del TLR9 pudiera reducir la inflamación alérgica dependiente de Th2, mediante la inducción de una respuesta Th1 [77] y comienza a haber evidencia de que la estimulación del TLR9 con ligandos sintéticos o semisintéticos, pudiera ser una opción de tratamiento para estados de inflamación crónica de tipo alérgica [78] y posiblemente esto

podiera aplicarse a la inflamación subclínica producida por obesidad, particularmente de utilidad para este creciente grupo de obesos-asmáticos.

El sistema inmune se rige por una gran cantidad de complejas y continuas interacciones (estímulos excitatorios e inhibitorios), más aún teniendo en cuenta que sus citocinas y receptores tienen como cualidad ser pleiotrópicos y redundantes.

Es importante mencionar que al contrario de la mayoría de los reportes existentes en la literatura, la población que estudiamos de obesos-asmáticos no presentan un fenotipo más grave o más sintomático a comparación de los asmáticos-eutróficos, aunque sí es más frecuente la presencia de asma en este grupo poblacional en incremento, que son los adolescentes obesos. Esto debe de ser considerado al tratar de extrapolar nuestros datos hacia otras poblaciones o países.

CONCLUSIONES

En conclusión, encontramos que en los pacientes obesos-asmáticos hay un perfil de citocinas de tipo Th2, sin embargo no presentan mayores síntomas o mayor gravedad, esto significa que la respuesta inflamatoria persistente de bajo grado generada por la obesidad pudiera contrarrestar en alguna medida la respuesta Th2, explicando la ausencia de mayores síntomas o de gravedad. Esto también explicaría la disminución de la capacidad de respuesta ante las infecciones de estos pacientes. La respuesta Th2 se correlaciona con la mayor expresión de TLR9 que al estar en mayor cantidad en los pacientes obesos-asmáticos y asmáticos eutróficos, lo convierten en un excelente blanco terapéutico para el control de estas enfermedades, ya que como se comentó anteriormente, hay estudios que reportan mejoría de los estados inflamatorios alérgicos con ligandos de TLR9. Para nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que investiga la expresión de TLR9 y la respuesta Th1 y Th2 en pacientes obesos-asmáticos. Este estudio debe ser el inicio de investigaciones futuras enfocadas a analizar la expresión y activación de los TLRs en pacientes asmáticos-obesos y no obesos, tratando de abarcar otros parámetros que se sabe son relevantes, como la IL-5, que se pretendía medir en este estudio pero que por falta de reactivo no fue posible, y otras adipocinas en diferentes fases de la enfermedad y con pacientes con y sin tratamiento.

CRONOGRAMA

Inclusión de pacientes al estudio: se invitó a participar a los familiares y pacientes de la clínica de alergia y de obesidad. Se les planteó a los pacientes y a los padres de cada uno de ellos la posibilidad de participar en el estudio. A los que aceptaron, se les otorgó el formato de consentimiento y asentimiento informado en caso de ser mayores de 10 años los pacientes, el cual fue firmado por los padres o por ambos.

Como primer paso se elaboró la historia clínica completa, la cual incluyó antecedentes familiares de asma, atopia y obesidad entre otros, seguido de exploración física completa, que incluyó la toma de medidas antropométricas, (peso, talla, circunferencia de cintura, pliegue tricótipal), signos vitales y exploración armada.

El siguiente paso fue la toma de una muestra de sangre para determinar la expresión de TLR9 y cuantificar la concentración de IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ . El trabajo experimental se realizó en colaboración con la Unidad en Investigación en Enfermedades Oncológicas. También se utilizó el suero de los pacientes para realizar las siguientes determinaciones: glucosa, colesterol, colesterol-LDL, colesterol-HDL, triglicéridos e insulina, con la colaboración del Laboratorio Central del Hospital. Todos los pacientes se encontraban en ayunas de por lo menos 12 h previas a la toma de muestra. Si el paciente no se encontraba en ayuno, se citó para otro día subsiguiente para la toma de muestra.

Todos los pacientes con diagnóstico de asma contaban con pruebas cutáneas y se les realizaron pruebas cutáneas para aeroalérgenos, que incluyeron: acaro, pastos, árboles y malezas.

Los controles fueron invitados de la consulta externa de pediatría o de familiares/amigos de los pacientes incluidos en el protocolo con asma u obesidad, se les realizó el mismo procedimiento y estudios con excepción de las pruebas cutáneas.

Posteriormente cuando se tuvieron todas las muestras (sangre y células) se procedió a la determinación de las distintas variables que se propusieron medir en el estudio, con excepción de la IL-5 (no se consiguió el reactivo), para después integrar las bases de datos con estos resultados y poder realizar el análisis estadístico completo y obtener los resultados. Por último se realizaron las tablas y se elaboró el reporte final.

REFERENCIAS

1. Redecke V., Häcker H., Datta S.K., et al. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol.* 2004;72(5):2739-43
2. Velasco G., Campo M., Manrique O.J., et al. Toll-like receptor 4 or 2 agonists decrease allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32(3):218-24.
3. Pacheco-Martinez M.M., Saucedo-Ramirez O., Del Rio-Navarro B., et al. Expresión del receptor tipo-Toll 4 en la inflamación alérgica de niños asmáticos-obesos. *Bol Med Hosp Infantil Mex.* 2011;68(4):278-283.
4. Kline J.N., Waldschmidt T.J., Businga T.R., et al. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol.* 1998;160(6):2555-9.
5. Jain V.V., Kitagaki K., Businga T., et al. CpG-oligodeoxynucleotides inhibit airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;110(6):867-72.
6. Jain V.V., Businga T.R., Kitagaki K., et al. Mucosal immunotherapy with CpG oligodeoxynucleotides reverses a murine model of chronic asthma induced by repeated antigen exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;285(5):L1137-46.
7. Kline J.N., Kitagaki K., Businga T.R., Jain V.V. Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;283(1):L170-9.
8. Kline J.N., Krieg A.M., Waldschmidt T.J., et al. CpG oligodeoxynucleotides do not require TH1 cytokines to prevent eosinophilic airway inflammation in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(6):1258-64.
9. Mansson A., Cardell L.O. Role of atopic status in Toll-like receptor (TLR) 7- and TLR9-mediated activation of human eosinophils. *Biol.* 2009;85:719–727.
10. Umetsu, D.T. and R.H. Dekruyff, Immune dysregulation in asthma. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(6):727-32.
11. Eisenbarth, S.C., et al., Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med,* 2002;196(12):1645-51.
12. Piggott, D.A., et al., MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen. *J Clin Invest.* 2005;115(2):459-67.
13. Kim, Y.K., et al., Airway exposure levels of lipopolysaccharide determine type 1 versus type 2 experimental asthma. *J Immunol.* 2007;178(8):5375-82.
14. Jeon, S.G., et al., TH2 and TH1 lung inflammation induced by airway allergen sensitization with low and high doses of double-stranded RNA. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(4):803-12.

15. Schwarze, J., et al., Respiratory syncytial virus infection results in airway hyperresponsiveness and enhanced airway sensitization to allergen. *J Clin Invest.* 1997;100(1): 226-33.
16. Schroder, N.W., et al., Innate immune responses during respiratory tract infection with a bacterial pathogen induce allergic airway sensitization. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(3):595-602 e5.
17. Kiss, A. et al., A new mechanism regulating the initiation of allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120:334-342.
18. Braun-Fahrlander, C., et al., Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med.* 2002;347(12):869-77.
19. Strachan, D.P., Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* 1989;299(6710):1259-60.
20. Schwartz, D.A., Does inhalation of endotoxin cause asthma? *Am J Respir Crit Care Med,* 2001;163(2):305-6.
21. Fried, S.K., D.A. Bunkin, and A.S. Greenberg, Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(3):847-50.
22. Ahima, R.S. and J.S. Flier, Leptin. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:413-37.
23. Shore, S.A. and R.A. Johnston, Obesity and asthma. *Pharmacol Ther.* 2006;110(1):83-102.
24. Shore S.A. Obesity and asthma: implications for treatment. *Curr Opin Pulm Med.* 2007;13(1):56-62.
25. Shore S.A. Obesity and asthma: lessons from animal models. *J Appl Physiol.* 2007; 102(2):516-28.
26. Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma-Summary Report 2007. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(5):S94-138.
27. Bateman, E.D., et al., Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J.* 2008;31(1):143-78.
28. Holgate, S.T., Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy.* 2008;38(6):872-97.
29. Black, J., The role of mast cells in the pathophysiology of asthma. *N Engl J Med.* 2002;346(22):1742-3.
30. Masoli, M., et al., The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy.* 2004;59(5):469-78.
31. Bacharier, L.B., et al., Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy.* 2008;63(1):5-34.
32. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma

- and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet*. 1998;351(9111): 1225-32.
33. Lai C.K., et al., Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*. 2009;64(6):476-83.
 34. Del-Rio-Navarro, B., et al., Asthma prevalence in children living in north Mexico City and a comparison with other Latin American cities and world regions. *Allergy Asthma Proc*. 2006;27(4):334-40.
 35. Olivera D.S., et al., Cellular mechanisms of mainstream cigarette smoke-induced lung epithelial tight junction permeability changes in vitro. *Inhal Toxicol*, 2007. 19(1): p. 13-22.
 36. Broeckaert F., et al., Serum clara cell protein: a sensitive biomarker of increased lung epithelium permeability caused by ambient ozone. *Environ Health Perspect*. 2000. 108(6):533-7.
 37. Shore S.A., Obesity and asthma: possible mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:1087-93.
 38. Finn PW, Bigby TD. Innate Immunity and Asthma. State of the Art. *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6:260-265.
 39. Male D., Brostoff J., Roth D., Roitt I., *Immunology*. Seventh ed. 2007: Elsevier Health. 552.
 40. Hammad H., Lambrecht B.N. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(3):193-204.
 41. Jahnsen F.L., et al. Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus. *J Immunol*. 2006;177(9):5861-7.
 42. Chieppa M., et al., Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J Exp Med*. 2006;203(13):2841-52.
 43. Vermaelen, K.Y., et al., Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J Exp Med*. 2001;193(1):51-60.
 44. Jakubzick, C., et al., Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways. *J Immunol*. 2006;176(6):3578-84.
 45. Rodríguez D., et al. Bacterial lipopolysaccharide signal through Toll-like receptor 4 suppresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity. *J Immunol*. 2003;171:1001-1008.
 46. Beutler, B., Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*, 2004. 40(12): p. 845-59.
 47. Creagh EM, et al. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that cooperate in innate immunity. *Trends Immunol*. 2006;27:352-357.

48. Lemaitre B, N.E., Michaut L, Reichhart JM, Hoffman JA., The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996;86(6): 973-983.
49. Lemaitre B, R.J., Hoffman JA., *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(26):14614-9.
50. Medzhitov R, Jenaway C.A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388:394-397.
51. Takeda K, K.T., Akira S., Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21: 335-76.
52. Brikos C., et al. Signalling of toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol*. 2008;183:21-50.
53. Simpson JL, Brooks C, Douwes J. Innate immunity in asthma. *Paediatr Respir Rev*. 2008;9(4):263-70.
54. Cole T.J., et al. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ*. 2000;320(7244):1240-3.
55. Santos-Preciado J.I., García-Avilés MA, León-Álvarez G, Quezada-Bolaños S, Tapia-Conyer R, La transición epidemiológica de las y los adolescentes en México. *Salud pública de México*. 2003;45(1):140-152.
56. Gennuso J., et al., The relationship between asthma and obesity in urban minority children and adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1998;152(12):1197-200.
57. Del-Rio-Navarro B.E., et al., The high prevalence of overweight and obesity in Mexican children. *Obes Res*. 2004;12(2):215-23.
58. Saint-Pierre P., et al., Are overweight asthmatics more difficult to control? *Allergy*, 2006;61(1):79-84.
59. To T., et al. Is obesity associated with asthma in young children? *J Pediatr*. 2004. 144(2):162-8.
60. Gilliland F.D., et al., Obesity and the risk of newly diagnosed asthma in school-age children. *Am J Epidemiol*. 2003;158(5):406-15.
61. Visser M., et al. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA*. 1999;282:2131-5.
62. Huang L. Li C. Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Res*. 2000;10(2): 81-92.
63. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(5):911-9.
64. Raso G.M., Esposito E., Coppola A., et al. Leptin potentiates IFN-gamma induced expression of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in murine macrophage J774A.1. *Br J Pharmacol*. 2002;137:799-804.

65. Meade C.J., Sheena J., Mertin J. Effects of the obese (ob/ob) genotype on spleen cell immune function. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1979;58(2):121-7.
66. Chandra R.K. Cell-mediated immunity in genetically obese C57BL/6J ob/ob) mice. *Am J Clin Nutr.* 1980;33(1):13-6.
67. Chan J.L., et al. Recombinant methionyl human leptin administration activates signal transducer and activator of transcription 3 signaling in peripheral blood mononuclear cells in vivo and regulates soluble tumor necrosis factor-alpha receptor levels in humans with relative leptin deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(3):1625-31.
68. Shore S.A. Obesity and asthma: possible mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(5):1087-93.
69. Delgado J., Barranco P., Quirce S. Obesity and Asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2008;18(6):420-5.
70. Luczyński W., Wawrusiewicz-Kurylonek N., Bossowski A., et al. Transformation of conventional T cells into regulatory T cells in children with metabolic syndrome. *Kardiol Pol.* 2011;69(12):1221-6.
71. Mat Z, Grensemann B, Yakin Y, et al. Effect of lipoteichoic acid on IL-2 and IL-5 release from T lymphocytes in asthma and COPD. *Int Immunopharmacol.* 2012;13(3):284-91.
72. Mai XM, Chen Y, Krewski D. Does leptin play a role in obesity-asthma relationship? *Pediatr Allergy Immunol.* 2009;20(3):207-12.
73. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765.
74. Esposito K, Pontillo A, Giugliano F, et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(3):1055-8.
75. Genuneit J, Cantelmo JL, Weinmayr G, et al; ISAAC Phase 2 Study Group. A multi-centre study of candidate genes for wheeze and allergy: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase 2. *Clin Exp Allergy.* 2009;39(12):1875-88.
76. Martin-Orozco E, Kobayashi H, Van Uden J, Nguyen MD, Kornbluth RS, Raz E. Enhancement of antigen-presenting cell surface molecules involved in cognate interactions by immunostimulatory DNA sequences. *Int Immunol.* 1999;11(7):1111-8.
77. Chen K, Xiang Y, Yao X, et al. The active contribution of Toll-like receptors to allergic airway inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(10):1391-8
78. Hayashi T, Raz E. TLR9-based immunotherapy for allergic disease. *Am J Med.* 2006;119(10):897.e1-6.

LIMITANTES DEL ESTUDIO

Por problemas con la obtención del kit para cuantificación de IL-5, no fue posible determinar esta interleucina, a pesar de que era uno de los objetivos del presente estudio, sin embargo se cuenta con muestra de cada uno de los pacientes analizados para su determinación en un futuro cercano.

En la mayoría de los estudios los pacientes se encuentran en distintas fases de la enfermedad: con y sin tratamiento, de reciente diagnóstico, con y sin exacerbación. En nuestro estudio tanto el grupo de obesos-asmáticos, como el grupo de asmático-eutróficos, resulto bastante homogéneo, ya que los pacientes se encontraban sin síntomas agudos y todos presentaban un fenotipo leve (bien controlados). Esto, por una parte, permite eliminar algunos sesgos al momento del análisis de las variables, sin embargo solo da una imagen estacionaria o limitada de la compleja y diversa enfermedad.

ANEXOS

FORMATO DE ASENTIMIENTO INFORMADO

Nombre del Estudio: Participación del TLR9 y de la IL-5 en el proceso inflamatorio de pacientes asmáticos-obesos

Médico del Estudio: Dra. Blanca del Rio, Dra. Carmen Maldonado

Se te invita a participar en un estudio de investigación. El presente formato de consentimiento tiene información que te ayudará a decidir si deseas participar en el mismo. Tómese el tiempo que necesite, lea cuidadosamente este formato y haga las preguntas que tenga al médico o personal del estudio.

Acerca de Este Estudio

El propósito de este estudio es:

- Determinar si enfermedades como el asma y la obesidad, dos enfermedades que afectan a millones de Mexicanos, niños y adultos, afectan el equilibrio del sistema inmunológico del paciente, con lo que estaría favoreciendo el incremento de los casos de las mismas.
- Si se logra demostrar estas alteraciones, se pueden idear nuevas formas de tratamiento para disminuir la prevalencia de el asma o la obesidad.

¿Qué se me pedirá hacer?

Si decide participar en el estudio, deberá hacer lo siguiente:

- Acudir en un par de ocasiones al servicio de alergia e inmunología de Hospital Infantil de México Federico Gómez, para practicar un examen médico completo y elaborar un expediente clínico, y la toma de 10 ml de sangre, para determinar la concentración de glucosa, colesterol, colesterol-LDL, colesterol-HDL y triglicéridos e insulina, la expresión del receptor tipo Toll-9 y titular la concentración de IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ . Marcadores de la enfermedad para determinar su asociación.

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

¿Qué efectos podrían ocasionar estas pruebas en mi?

El riesgo de que se produzca algún efecto secundario es mínimo, probablemente sienta dolor o ardor durante la toma de sangre, se han reportado casos de hipotensión generado por el estrés que este procedimiento implica.

¿Se utilizará algún tipo de medicamento?

Se aclara que no estamos utilizando ningún medicamento.

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

El beneficio inmediato es la detección oportuna de las alteraciones del metabolismo, indicando un tratamiento oportuno y limitando posibles daños.

Un beneficio potencial para toda la población de niños Mexicanos es determinar o no la asociación que puede existir entre las alteraciones del sistema inmune y las enfermedades descritas. Lo que nos dará una línea nueva de tratamiento, que con más estudios pudiera ser de las soluciones al problema.

¿Cuáles son mis opciones si decido no participar en el estudio?

No está comprometido a participar en el estudio, si en su momento no lo desea, no existe ninguna acción en su contra, la atención que recibe de manera regular en el hospital seguirá siendo la

misma, sin distinción alguna. El médico que lo atiende está obligado a indicar el tratamiento más apropiado.

¿De qué manera se protegerá mi privacidad?

Si usted decide participar en este estudio, el médico y el equipo de investigación del estudio utilizarán la información de la salud de su hijo(a) para realizar el presente estudio. Esta información puede incluir el nombre, dirección, número de teléfono, historia médica e información recopilada en sus visitas del estudio. Esta información sobre la salud puede ser obtenida de su médico de cabecera u otros profesionales de la salud.

Usted puede retirar su permiso para usar y compartir la información sobre su salud en cualquier momento, solicitándolo por escrito al médico del estudio. En caso que usted procediera de esta manera, no podrá permanecer en este estudio.

¿Hay algún costo involucrado con el estudio? o ¿Se me pagará?

Usted no recibirá pago alguno por participar en este estudio, tampoco se le cobrará. Los gastos de los procedimientos, exámenes de laboratorio y gabinete descritos en el protocolo, así como los costos de las consultas médicas a las que tenga que acudir, serán proporcionadas por el hospital.

¿A quién debo llamar si tengo preguntas acerca de algo relacionado al estudio?

- El estudio: Rodolfo Muriel Vizcaino al 52289917 ext. 1120
- Problemas con el estudio: Dra. Blanca estela Del Rio Navarro al 5228-9917 ext. 1121

Al firmar a continuación, acepto que:

- He leído este formato de consentimiento y quiero participar
- He tenido la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas.
- Entiendo que la participación en este estudio es voluntaria.
- Puedo elegir no participar en el estudio o que lo abandone en cualquier momento, comunicándoselo al médico del estudio.

_____	_____
Firma y Nombre de mi hijo.	Fecha
_____	_____
Firma y Nombre de la Madre	Fecha
_____	_____
Firma y Nombre del Padre	Fecha
_____	_____
Firma y Nombre del Médico	Fecha

Testigo Nombre y firma _____

Dirección: _____

Relación que tiene con el paciente: _____

Testigo Nombre y firma _____

Dirección: _____

Relación que tiene con el paciente: _____

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre del Estudio: Participación del TLR9 y de la IL-5 en el proceso inflamatorio de pacientes asmáticos-obesos

Médico del Estudio: Dra. Blanca del Rio, Dra. Carmen Maldonado

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

Acerca de Este Estudio

El propósito de este estudio es:

- Determinar si enfermedades como el asma y la obesidad, dos enfermedades que afectan a millones de Mexicanos, niños y adultos, afectan el equilibrio del sistema inmunológico del paciente, con lo que estaría favoreciendo el incremento de los casos de las mismas.
- Si se logra demostrar estas alteraciones, se pueden idear nuevas formas de tratamiento para disminuir la prevalencia del asma o la obesidad.

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

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

- Que acuda en un par de ocasiones al servicio de alergia e inmunología de Hospital Infantil de México Federico Gómez, para practicar un examen médico completo y elaborar un expediente clínico, y la toma de 10 ml de sangre, para determinar la concentración de glucosa, colesterol, colesterol-LDL, colesterol-HDL y triglicéridos e insulina, la expresión del receptor tipo Toll-9 y titular la concentración de IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ . Marcadores de la enfermedad para determinar su asociación.

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

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

El riesgo de que se produzca algún efecto secundario es mínimo, probablemente su hijo(a) sienta dolor o ardor durante la toma de sangre, se han reportado casos de hipotensión generado por el estrés que este procedimiento implica.

¿Se utilizará algún tipo de medicamento?

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

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

El beneficio inmediato es la detección oportuna de las alteraciones del metabolismo, indicando un tratamiento oportuno y limitando posibles daños.

Un beneficio potencial para toda la población de niños Mexicanos es determinar o no la asociación que puede existir entre las alteraciones del sistema inmune y las enfermedades descritas. Lo que nos dará una línea nueva de tratamiento, que con mas estudios pudiera ser de las soluciones al problema.

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

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

siendo la misma, sin distinción alguna. El médico que lo atiende está obligado a indicar el tratamiento más apropiado.

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

Si usted decide participar en este estudio, el médico y el equipo de investigación del estudio utilizarán la información de la salud de su hijo(a) para realizar el presente estudio. Esta información puede incluir el nombre, dirección, número de teléfono, historia médica e información de su hijo(a) recopilada en sus visitas del estudio. Esta información sobre la salud puede ser obtenida de su médico de cabecera u otros profesionales de la salud.

Usted puede retirar su permiso para usar y compartir la información sobre la salud de su hijo(a), en cualquier momento, solicitándolo por escrito al médico del estudio. En caso que usted procediera de esta manera, su hijo(a) no podrá permanecer en este estudio.

¿Hay algún costo involucrado con el estudio? o ¿Se me pagará?

Usted no recibirá pago alguno por participar en este estudio, tampoco se le cobrará. Los gastos de los procedimientos, exámenes de laboratorio y gabinete descritos en el protocolo, así como los costos de las consultas médicas a las que tenga que acudir, serán proporcionadas por el hospital.

¿A quién debo llamar si tengo preguntas acerca de algo relacionado al estudio?

- El estudio: Rodolfo Muriel Vizcaino al 52289917 ext. 1120
- Problemas con el estudio: Dra. Blanca estela Del Rio Navarro al 5228-9917 ext. 1121

Al firmar a continuación, acepto que:

- He leído este formato de consentimiento.
- He tenido la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas.
- Entiendo que la participación en este estudio es voluntaria.
- Puedo elegir que mi hijo(a) no participe en el estudio o que lo abandone en cualquier momento, comunicándoselo al médico del estudio.

_____	_____
Firma y Nombre de mi hijo.	Fecha
_____	_____
Firma y Nombre de la Madre	Fecha
_____	_____
Firma y Nombre del Padre	Fecha
_____	_____
Firma y Nombre del Médico	Fecha

Testigo Nombre y firma _____

Dirección: _____

Relación que tiene con el paciente: _____

Testigo Nombre y firma _____

Dirección: _____

Relación que tiene con el paciente: _____