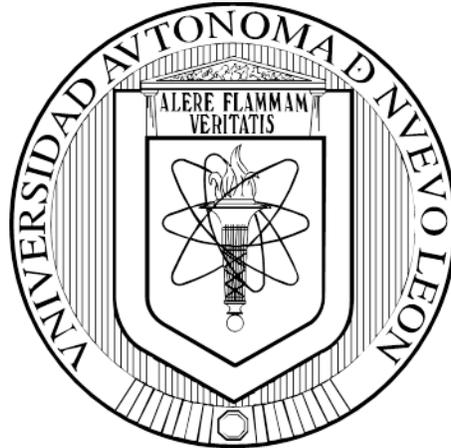


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**"LA MUTACIÓN EN EL ALELO  $\beta$ -31\*<sup>C</sup> MAS LA PRESENCIA DE *Staphylococcus aureus* Y *Haemophilus influenzae* INCREMENTAN EL RIESGO DE AMIGDALITIS RECURRENTE EN UNA POBLACIÓN MEXICANA**

**POR**

**BALTAZAR GONZÁLEZ ANDRADE**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA**

**MAYO, 2018**

**“LA MUTACIÓN EN EL ALELO 1 $\beta$ -31\*C MAS LA PRESENCIA DE *Staphylococcus aureus* Y *Haemophilus influenzae* INCREMENTAN EL RIESGO DE AMIGDALITIS RECURRENTE EN UNA POBLACION MEXICANA”**

**Aprobación de la tesis:**

---

**Dra. C. Elvira Garza González**  
**Directora de Tesis**

---

**Dr. med. José Carlos Jaime Pérez**  
**Miembro**

---

**Dr. med. Adrián Camacho Ortiz**  
**Miembro**

---

**Dr. med. Jorge Enrique Cruz Ponce**  
**Miembro**

---

**Dr. med. Francisco Javier Bosques Padilla**  
**Miembro**

---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
**Subdirector de Estudios de Posgrado**

## **DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS**

Agradecimiento a Dios por la vida que me ha sido prestada.

Este trabajo está dedicado a mi esposa María Mónica Rangel Fuentes por su apoyo incondicional a lo largo de estos años.

A mis padres María del Carmen Andrade Romero y José Concepción González Pérez por la formación, y los valores inculcados así como a mis hermanos y hermanas.

A mi Directora de Tesis la Dra. Elvira Garza González por su paciencia y dirección en este proyecto así como a todo el equipo que participó en el mismo, que por razones de espacio no puedo mencionar a todos.

# TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
Capítulo II.....	3
MARCO TEÓRICO.....	3
Antecedentes indirectos.....	3
Antecedentes generales.....	3
Tratamiento de la enfermedad inflamatoria amigdalina.....	4
Agentes causales.....	4
Staphylococcus aureus.....	5
Haemophilus influenzae.....	6
Formación de biofilm.....	6
Inmunogenética de la enfermedad.....	7
Interleucina-1B.....	9
Antecedentes directos.....	10
Capítulo III.....	11
JUSTIFICACIÓN.....	11
Capítulo IV.....	12
OBJETIVOS.....	12
Capítulo V.....	13
HIPÓTESIS.....	13
Capítulo VI.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Diseño metodológico del estudio.....	14
Sitio del estudio.....	14
Bioética.....	14
Población de estudio.....	14
Criterios de selección de pacientes.....	15
Criterio de inclusión.....	15
Criterios de exclusión.....	16

Criterios de eliminación.....	16
Exámenes microbiológicos.....	16
Producción de biopelícula.....	16
Extracción del ADN genómico humano.....	17
Detección del polimorfismo -308 en el gen TNF-A y el -31 en el gen IL-1B.....	17
Capítulo VII.....	19
ANALISIS ESTADÍSTICO.....	19
Capítulo VIII.....	20
RESULTADOS.....	20
Resultados microbiológicos.....	20
Asociaciones genotípicas y alélicas.....	20
Capítulo IX.....	22
DISCUSIÓN.....	22
Capítulo X.....	25
CONCLUSIÓN.....	25
Capítulo XI.....	26
ANEXOS.....	26
Tablas.....	26
Consentimientos informados.....	28
Bibliografía.....	38

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Evaluación microbiológica de las amígdalas extraídas y del hisopado de superficie amigdalina de todos .....	26
Tabla 2	Frecuencias alélicas y genotípicas de <i>TNFA-308G/A</i> y <i>IL1B-31C/T</i> en amigdalitis recurrente y sujetos controles.....	27
Tabla 3	Odds ratios (OR) con 95% de intervalo de confianza (ICs) para factores de riesgo.....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>A</b>	Adenina
<b>G</b>	Guanina
<b>C</b>	Citosina
<b>T</b>	Tiamina
<b>Mg</b>	Miligramos
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>IL</b>	Interleucina
<b>OR</b>	Odds Ratio
<b>BSI</b>	Infección del torrente sanguíneo
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>COX2</b>	Ciclooxigenasa 2
<b>PLAT2</b>	Fosfolipasa A2
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintetasa inducible
<b>iRAKs</b>	Quinasas asociadas al receptor de IL
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>SDS</b>	Duodecil sulfato de sodio
<b>MI</b>	Mililitro
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>HCL</b>	Ácido clorhídrico
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sodio

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad inflamatoria amigdalina es una patología frecuente que se puede presentar como cuadros de amigdalitis aguda de repetición o hipertrofia amigdalina crónica, siendo esto una causa importante de morbilidad en los niños. En los Estados Unidos aproximadamente el 10% de los antibióticos prescritos son por faringoamigdalitis aguda.

El objetivo del presente estudio fue estimar la contribución relativa de los factores inmunogenéticos y microbiológicos en el desarrollo de amigdalitis recurrente en una población mexicana.

Se incluyeron 138 pacientes consecutivos con amigdalitis recurrente/crónica, clínicamente confirmados y con indicación para amigdalectomía de acuerdo con los criterios de la Academia Americana de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. Los pacientes se reclutaron en el Hospital Universitario “Dr. José E González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Hospital de Alta Especialidad Materno-Infantil de la Secretaría de la Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León.

La media de edad de los pacientes fue 6.05 años  $\pm$  3.0 en los pacientes masculinos y media de edad 5  $\pm$  XX años en los pacientes femeninos. El rango de edad fue de 1 a 15 años. Se incluyeron 195 sujetos no relacionados como controles, mayores de 18 años sin historia clínica de enfermedad amigdalina.

Para evaluar la contribución microbiana se obtuvieron muestras de la superficie amigdalina para cultivo en ambos grupos (casos y controles) y muestras del tejido

producto de la amigdalectomía para cultivo en los casos. También fue evaluada la producción de biopelícula por las bacterias aisladas.

Para valorar el componente inmunogenético, se obtuvo el ADN de los leucocitos de sangre periférica obtenida de los sujetos de ambos grupos, y se llevó a cabo la tipificación del polimorfismo de un simple nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) factor de necrosis tumoral alfa (TNF) – 308 G/A (*TNF alfa -308 G/A*) y para el SNP de la interleucina (IL) 1beta -31C/T (*IL1B -31C/T*).

En los sujetos control se asiló microbiota normal en todos ellos. En el grupo pacientes, las especies patógenas más frecuentes detectadas fueron *Staphylococcus aureus* (48.6% 67/138) y *Haemophilus influenzae* (31.9% 44/138), que se encontraron con mayor frecuencia en muestras de pacientes que en muestras de los sujetos sanos ( $p < 0,0001$ ). Es importante destacar que 41/54 (75.9%) de los aislamientos de *S. aureus* fueron productores de biopelícula (18 débiles y 23 fuertes), mientras que 17/25 (68%) de *H. influenzae* fueron productores de biopelícula (10 débiles y 7 productores de biopelícula fuertes).

Los pacientes con al menos una copia del alelo *IL1B-31 \* C* tuvieron un mayor riesgo de amigdalitis recurrente (OR = 4,03; IC del 95% = 1,27-14,27; P = 0,013).

No hubo diferencia entre los genotipos de *TNFA-308* entre los grupos. Cuando se consideró la presencia de *IL1B-31 \* C* más *S. aureus*, *IL1B-31 \* C* más productor de biopelícula de *S. aureus*, *IL1B-31 \* C* más *H. influenzae* o *IL1B-31 \* C* más *H. influenzae*, el OR tiende a infinito. Así, la presencia del alelo *IL1B-31 \* C* más la presencia de *S. aureus* y / o *H. influenzae* podría estar relacionada con el desarrollo de amigdalitis en esta población mexicana en particular.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Antecedentes indirectos

#### Antecedentes generales

La enfermedad inflamatoria amigdalina es una entidad infantil que involucra el parénquima de las amígdalas palatinas. Es una patología frecuente que se puede presentar como cuadros de amigdalitis aguda de repetición y/o hipertrofia amigdalina crónica, siendo una causa importante de morbilidad. Existen pocos estudios sobre la prevalencia de la enfermedad y se ha reportado que varía entre 11.7% y 12.1% de acuerdo con la diferentes poblaciones.

La definición de enfermedad recurrente puede variar, pero los criterios utilizados actualmente son el desarrollo de 5 o más episodios de amigdalitis verdadera al año, los síntomas recurrentes durante al menos un año y los episodios que son incapacitantes y que impiden el funcionamiento normal (1)

Un episodio de amigdalitis infecciosa se define como dolor faríngeo y uno o más de los siguientes síntomas: fiebre igual o mayor a 38.3° C, adenopatía cervical, exudado amigdalino, y prueba positiva para *Streptococcus pyogenes*, el cual es reportado como el agente causal bacteriano número uno de faringitis, aunque otras especies bacterianas pueden producir también faringitis, tales como los Estreptococos de beta-hemolíticos de los grupos C y G, *Arcanobacterium*, *Neisseria gonorrhoeae*, su frecuencia es menor (2).

La mayoría de las enfermedades de las vías respiratorias superiores en la infancia tienden a mejorar con el tiempo; sobre todo con la maduración del sistema inmune, aunque la amigdalitis recurrente no se resuelve espontáneamente y requiere tratamiento. Esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia en pacientes menores de 15 años, aunque puede presentarse también en la edad adulta, su frecuencia es mucho menor.

### **Tratamiento de la enfermedad inflamatoria amigdalina**

Las opciones disponibles para el tratamiento de la enfermedad recurrente son la atención quirúrgica (amigdalectomía) y médica con resultados muy similares (3). Algunos casos no se resuelven llegando a requerir de cirugía y de acuerdo con guías prácticas de la Academia Americana de Otorrinlaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello (AAOC&C). En general, se recomienda una amigdalectomía cuando un paciente presenta:

- 7 episodios en el último año
- 5 episodios por año en los últimos 2 años
- 3 episodios por año en los últimos 3 años.

### **Agentes causales**

La amigdalitis recurrente se ha relacionado con una amplia variedad de agentes infecciosos (4), siendo los más comunes *S. pyogenes*, seguidos por los estreptococos beta hemolíticos de los grupos C y G;, aunque también se ha asociado a la presencia de *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* (5-7).

## ***Staphylococcus aureus***

El género *Staphylococcus* son un amplio grupo de bacterias Gram-positivas, cuyo diámetro es entre 0.5 y 1.5 micras. Se caracterizan porque se dividen en agrupaciones que asemejan racimos de uva y, a la fecha, se han reportado 35 especies conocidas con 17 subespecies en el género *Staphylococcus*.

El género *Staphylococcus* tiene una gran capacidad de adaptación, por lo cual afectan a todas las especies conocidas de mamíferos, incluyendo a los roedores comunes de laboratorio. Es por ello por lo que, gracias a su fácil propagación, pueden transmitirse de una especie a otra, siendo frecuentes los casos humano-animales y viceversa. De aquí surge la importancia de conocer más acerca de este patógeno, ya que, además de los animales, los mecanismos de invasión abarcan también fomites y el contacto de persona a persona.

*Staphylococcus aureus*, es una de las principales causas de infecciones en el torrente circulatorio (BSI), infecciones de heridas e intoxicaciones ocasionadas por alimentos. Estos brotes están surgiendo de manera alarmante en la mayoría de los países industrializados. La patogenicidad de las infecciones por *S. aureus* se relaciona con diversos componentes de la superficie bacteriana; de manera general, los componentes de la bacteria son los peptidoglicanos y ácidos teicoicos, además de la proteína A. Así pues, la patogenia provocada por este microorganismo surge cuando se produce la combinación de los factores de virulencia con la disminución de las defensas del huésped; estas condiciones propician que *S. aureus* posea características de virulencia y daño particulares; aunado a esto, el patógeno ha ido desarrollando múltiple resistencia contra los antibióticos, propiciando que cada vez

sea mucho más difícil el tratamiento de las enfermedades ocasionadas por esta bacteria

### ***Haemophilus influenzae***

*H. influenzae*, es un cocobacilo Gram negativo, del cual se han descrito 6 serotipos en base a su polisacárido capsular. Estos serotipos son los a, b, c, d, e, f. Específicamente el serotipo tipo b, se asocia al desarrollo de infecciones graves, en particular en niños pequeños. Puede provocar muchos tipos enfermedades invasivas tales como meningitis, neumonía, celulitis, artritis séptica y epiglotitis. El único reservorio conocido de *H. influenzae* está en los humanos, quienes la pueden portar sin estar enfermos. Esta bacteria vive en la nasofaringe de sujetos sanos y su presencia en este sitio sirve como fuente de transmisión de la bacteria a otros individuos. Se propaga por el aire, a través de gotitas emitidas por la respiración de personas enfermas o incluso de sujetos sanos.

### **Formación de biofilm**

Las bacterias que se adhieren a los dispositivos médicos implantados o al tejido dañado pueden convertirse en la causa de infecciones persistentes. Estas bacterias se encierran en una matriz hidratada de polisacáridos y proteínas, formando una capa viscosa conocida como biopelícula. El examen microscópico directo de superficies colonizadas en las amígdalas muestra densos agregados de bacterias unidas por polímeros extracelulares difusos.

La formación de biopelícula es importante porque este modo de crecimiento está asociado con la naturaleza crónica de las infecciones posteriores y con su resistencia inherente a la quimioterapia antibiótica.

*In vivo*, los antibióticos pueden suprimir los síntomas de la infección al matar a las bacterias flotantes derramadas de la población adjunta, pero no logran erradicar las células bacterianas aún incrustadas en la biopelícula. Cuando la quimioterapia antimicrobiana se detiene, la biopelícula puede actuar como un *nidus* para la recurrencia de la infección. Las infecciones de biopelícula generalmente persisten hasta que la superficie colonizada se extirpa quirúrgicamente del cuerpo (8).

Se ha reportado que las bacterias involucradas en el desarrollo de amigdalitis recurrente son capaces de formar biopelícula (9) pero debido a la escasez de controles adecuados no se ha podido concluir que este factor sea la causa específica para la enfermedad amigdalina recurrente.

### **Inmunogenética de la enfermedad**

En el desarrollo de amigdalitis recurrente, el factor bacteriano juega un papel importante, pero puede no ser el único, porque ciertos antecedentes genéticos pueden estar relacionados con una inflamación más severa. Variantes genéticas de citocinas pueden alterar la respuesta inflamatoria, y varios genes que codifican las citoquinas pro-inflamatorias.

Una de las citocinas más importantes en la respuesta inflamatoria es el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF $\alpha$ ), el cual tiene un papel central en la patogénesis de diversas enfermedades. Aun cuando, el TNF $\alpha$  es una citoquina fundamental en los

mecanismos normales de la inmunidad innata y adquirida, su sobreexpresión parece jugar un papel central en una gran variedad de patologías.

Se ha descrito que la participación de polimorfismos genéticos de citoquinas, entre éstos, algunos de los que afectan a TNF $\alpha$ , predisponen al desarrollo de determinadas enfermedades como consecuencia de un posible aumento de la actividad transcripcional de los genes que las codifican.

De los polimorfismos genéticos descritos para TNF $\alpha$ , se ha descrito uno que afecta a la posición -308 de su región promotora ya que altera las secuencias reguladoras de la transcripción. Este polimorfismo define alelos que se ha asociado con la presencia y/o severidad de algunas enfermedades infecciosas, autoinmunes, inflamatorias y otros estados patológicos.

En este sentido, se ha descrito polimorfismos de un solo nucleótido (*TNFA*)-308G / A (rs1800629), con la guanina (G) como variante común y la adenina (A) como la menos común. El alelo *TNFA*-308A muestra una transcripción génica de 6 a 7 veces superior al comparado con el alelo G común (10, 11).

El TNF $\alpha$  es una molécula secretoria no glicosilada, de 17 kDa, que deriva de una de 26 kDa producida principalmente por macrófagos. En condiciones fisiológicas, forma un homotrímero de 55 kDa, no-covalentemente estabilizado (12). Posee 2 receptores de transmembrana, uno de 55 kDa y otro de 75 kDa.

El TNF $\alpha$  es un agente clave en la inmunidad del huésped, con actividad antitumoral, antiviral y antimicrobiana. Induce crecimiento tisular, diferenciación de tejidos e inmunorregulación.

## **Interleucina-1 B**

La interleuquina-1 (IL-1) es un miembro importante del grupo de las citoquinas pro inflamatorias. Pertenece a una supe familia de citoquinas relacionadas que lleva su nombre, de las cuales se conocen tres agonistas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18) y un antagonista del receptor (IL-1Ra).

La IL-1 tiene actividad biológica mediante la inducción de genes que codifican para la ciclooxigenasa tipo 2 (COX2), la fosfolipasa A tipo 2 (PLAT2) y el óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). Las consecuencias biológicas de esta inducción se traducen en una franca respuesta inflamatoria.

La IL-1 se une a dos receptores específicos, cuando lo hace con el receptor tipo I (IL-1RI) desencadena una vía de señalización intracelular que incluye la fosforilación proteica mediada por quinasas conocidas como IRAKs (quinasas asociadas al receptor de IL), y que es responsable de los efectos biológicos de la citoquina. Por otro lado, la unión al receptor tipo II (IL-1RII) no desencadena ninguna señal.

Los genes de la mayoría de los miembros de la familia de IL-1 se encuentran localizados en el brazo largo del cromosoma 2. Los loci polimórficos de estos genes parecen estar implicados en una amplia gama de enfermedades, aunque los resultados son motivo de controversia. Particularmente, el SNP -31C / T (rs1143627) en el promotor del gen de la Interleucina (IL) 1B se ha asociado con una inflamación más fuerte en múltiples poblaciones, incluida la población mexicana (13-15).

### **Antecedentes directos**

Se han reportado polimorfismos genéticos como factores de riesgo para el desarrollo de amigdalitis recurrente, pero la evidencia no es lo suficientemente fuerte (1). Por ejemplo, un estudio de casos y controles indicó que la atopia parental y la historia de la amigdalectomía parental predecirían la tonsilitis subsiguiente en sus hijos (16).

## CAPÍTULO III

### JUSTIFICACIÓN

La enfermedad inflamatoria amigdalina es una patología frecuente que se puede presentar como cuadros de amigdalitis aguda de repetición o hipertrofia amigdalina crónica, siendo esto una causa importante de morbilidad en los niños.

Se conoce poco sobre la etiopatogenia de dicha enfermedad, siendo el componente inmunopatogénico algo poco estudiado,

Por medio de la obtención del ADN de los leucocitos de sangre periférica se puede evaluar este factor, mediante la tipificación del polimorfismo de un simple nucleótido (SNP), como lo es factor de necrosis tumoral alfa (TNF) – 308 G/A (*TNF alfa -308 G/A*) y para el SNP de la interleucina (IL) 1beta -31C/T (*IL1B -31C/T*).

A lo anterior, la presencia sumada de especies patógenas como *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* podría estar relacionada con el desarrollo de amigdalitis en esta población mexicana en particular.

## **CAPÍTULO IV**

### **OBJETIVOS**

#### **Objetivo primario**

Determinar si existe una asociación entre la presencia de los polimorfismos genéticos *TNF- $\alpha$  308 G/A*, y la *IL1- $\beta$  -31 C/T*, con el desarrollo de enfermedad inflamatoria amigdalina.

#### **Objetivos secundarios**

Determinar la microbiota presente en amígdalas en los pacientes de estudio.

Genotipificar los polimorfismos en, *TNF-a*, e *IL-1 b*.

## **CAPÍTULO V**

### **HIPÓTESIS**

Los polimorfismos genéticos de un simple nucleótido del TNF- $\alpha$ , e IL-1 $\beta$ , se asocian a una respuesta inflamatoria exagerada que favorece el desarrollo de enfermedad amigdalina.

## **CAPITULO VI**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Diseño metodológico del estudio**

Diseñamos un estudio observacional, transversal, comparativo, prospectivo, no ciego, de Casos y Controles.

#### **Sitio del estudio**

El estudio fue realizado en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, Un hospital de enseñanza de 450 camas con un promedio de 22,000 egresos anuales.

#### **Bioética**

El estudio fue aprobado por el comité de ética local con el número OTI-007. Todos los participantes firmaron consentimiento informado previo aleatorización

#### **Población de estudio**

Se incluyeron 138 pacientes no relacionados con la amigdalitis recurrente clínicamente confirmada y una indicación de amigdalectomía según la Academia Americana de Otorrinolaringología-Cirugía de Cabeza y Cuello (2, 17) (media de edad 6.05 años  $\pm$  DE, 3.00, rango de edad: 1-15 años. También se investigaron 195 sujetos sin antecedentes clínicos de amigdalitis recurrente como controles (media de edad = 28,18 años  $\pm$  DE, 10,26, rango de edad: 18-68 años). Todos los

controles tenían más de 18 años para minimizar el riesgo de amigdalitis recurrente. El tiempo de reclutamiento fue de abril de 2015 a abril de 2016.

Los pacientes fueron incluidos de agosto de 2014 a mayo de 2015 en los hospitales de Nuevo León, México. Este estudio se realizó con la aprobación del Comité de Ética Local de hospitales: Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", Universidad Autónoma de Nuevo León (Aprobación OTI-007) y Hospital Materno Infantil de Alta Especialidad, Secretaría de Salud de Nuevo León (Aprobación 062/2014).

Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los sujetos y pacientes. Cuando lo ameritaba, el consentimiento informado por escrito se obtuvo de cuidadores, o tutores en nombre de los menores inscritos en este estudio.

## **Criterios de selección de pacientes**

### **Criterios de inclusión**

Fueron incluidos todos los pacientes entre 1 y 15 años de edad con diagnóstico de amigdalitis aguda de repetición o hipertrofia amigdalina crónica que cumplan los criterios para amigdalectomía según la Academia Americana de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello.

Se incluyeron a los pacientes cuyos padres o tutores aceptaron la participación en el estudio mediante un consentimiento informado que incluye información sobre estudios con ADN de los pacientes.

### **Criterios de exclusión**

Se excluyeron los pacientes que no cumplieron con los criterios para amigdalectomía según la Academia Americana de Otorrinolaringología, pacientes cuyos padres o tutores no aceptaron participar en el estudio y pacientes que cumplieron los criterios para amigdalectomía, pero que ésta no pueda ser llevada a cabo por otra razón médica que no sea enfermedad amigdalina

### **Criterios de eliminación**

Fueron eliminados los pacientes ó sus padres o tutores que no desearon continuar en el estudio

### **Exámenes microbiológicos**

De todos los sujetos control, se obtuvo un cultivo de hisopo de las amígdalas para la evaluación microbiológica. De los pacientes con amigdalitis recurrente, las amígdalas extraídas (parcialmente maceradas) y los hisopados de amígdalas se cultivaron por métodos estándar.

### **Producción de biopelícula**

La producción de biopelícula de los aislamientos de *S. aureus* y *H. influenzae* se semicuantificó espectrofotométricamente a una densidad óptica de 595 nm (OD<sub>595</sub>: OD<sub>595</sub> <0,12, no productores de biopelícula, 0,13 <OD<sub>595</sub> <0,24, De biopelícula y OD<sub>595</sub> > 0,25, Fuertes productores de biopelícula) después de la tinción de cristal violeta de acuerdo con los métodos informados anteriormente para *S. aureus* (18) o para *H. influenzae* (19, 20).

Se emplearon las cepas de control *S. aureus* (ATCC 29213, productor fuerte de biopelículas), *Escherichia coli* (ATCC 25922, productor débil de biopelícula) y *Staphylococcus hominis* (ATCC 27844).

Todos los aislamientos se ensayaron por cuadruplicado en dos experimentos diferentes llevados a cabo en días diferentes.

### **Extracción del ADN genómico humano**

El DNA genómico humano se extrajo de 250 mL de sangre completa, la cual se suspendió en amortiguador de lisis (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 5 mM EDTA, 0.2% duodecil sulfato de sodio [SDS], 200 mM NaCl). El DNA se extrajo dos veces en un volumen de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), y la fase superior se precipitó con etanol al 100% y se lavó dos veces con etanol al 70%. El DNA se dejó secar al aire y se resuspendió en 200 µl de amortiguador Tris-EDTA.

### **Detección del polimorfismo -308 en el gen TNF-A y el -31 en el gen IL-1B**

Los genotipos TNFA-308 (G / A), y ILB-31 (C / T) y se determinaron mediante pirosecuenciación. La PCR se realizó con condiciones estándar utilizando iniciadores descritos previamente. Los productos de PCR biotinilados se inmovilizaron en perlas paramagnéticas de Sepahrosa recubiertas con estreptavidina.

El DNA en las perlas se desnaturalizó con NaOH 0,5 M y se añadieron a 45  $\mu$ l de buffer con el primer de secuenciación. Todas las reacciones se secuenciaron con un PSQ 96MA (Pyrosequencing AB Suecia) (21).

## CAPITULO VII

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se determinó si la frecuencia genética de los sujetos control se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg mediante una prueba de *chi* cuadrada.

Se determinó si existían diferencias estadísticamente significativas mediante las pruebas de *t* de Students de 2 colas, *chi* cuadrada o la prueba exacta de Fisher.

Se consideró significativo un valor de  $P < 0,05$ . El odds ratio (OR) y el correspondiente intervalo de confianza del 95% (IC del 95%) se calcularon utilizando la versión 20.0 del software SPSS Statistics (IMB Corporation). Se utilizó el modelo dominante de la herencia para el análisis.

## CAPITULO VIII

### RESULTADOS

#### Resultados Microbiológicos

Se encontró flora normal, sin patógenos potenciales, en los cultivos de los controles. En los casos, y considerando tanto el cultivo de raspado de amígdalas y de amígdalas extraídas, las especies detectadas con mayor frecuencia fueron *S. aureus* y *H. influenzae*. Esta diferencia fue significativa cuanto se comparó con el grupo control ( $p < 0.0001$ ). Los cultivos de las amígdalas extraídas presentaron mayor diversidad y cantidad de patógenos potenciales; los patógenos más frecuentes fueron *S. aureus* (67/138; 48.6%), *H. influenzae* (44/138; 31.9%) y *S. pyogenes* (21/138; 15.2%) (Tabla1). Se seleccionaron al azar 54 cultivos de *S. aureus* para evaluación de biopelícula y se detectó que 41/54 (75.9%) fueron productores de ésta (18 débiles y 23 fuertes). De los cultivos de *H. influenzae*, 25 fueron elegidos al azar para evaluación de biopelícula, 17/25 (68%) eran productores (10 débiles y 7 fuertes).

#### Asociaciones genotípicas y alélicas

La distribución de alelos y genotipos se muestra en la tabla 2. Las frecuencias genotípicas se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg para todos los loci estudiados. Pacientes con al menos una copia del *alelo IL1B31\*C* tuvieron mayor riesgo para amigdalitis (RM = 4.03; 95% IC 1.27 – 14.27;  $p 0.013$ ). No hubo diferencia significativa para el locus *TNFA-308*.

Considerando el alelo mutado *IL1B31\*C* en el grupo control, el poder de nuestro análisis (alfa = 0.05) fue de 0.9853 en 138 casos y 195 controles. Cuando consideramos la presencia de *IL1B31\*C* más *S. aureus*; *IL1B31\*C* más *S. aureus* productor de biopelícula; *IL1B31\*C* más *H. influenzae*; *IL1B31\*C* más *H. Influenzae* productor de biopelícula, la razón de momios se proyectaba al infinito (Tabla 3).

## CAPITULO IX

### DISCUSIÓN

En este estudio se pretendió analizar las contribuciones inmunogenéticas y microbiológicas para desarrollar amigdalitis de repetición. Aunque los cultivos extraídos de aplicador ó del tejido amigdalino del mismo paciente fueron consistentes en el 60% de los pacientes, el 40% restante de los cultivos extraídos de las amígdalas tendían a tener mayor en número y diversidad de especies, incluyendo especies patógenas. El *S. aureus* intracelular ha sido reportado como la mayor causa de amigdalitis recurrente, sugiriendo que utiliza su localización intracelular para evadir el efecto de los antibióticos y la respuesta inmune del hospedero (22). Esto podría explicar la discrepancia entre los cultivos extraídos de los hisopos y de las amígdalas en algunos casos, ya que las bacterias podrían estar en células de capas más profundas del tejido, y no podrían ser detectadas cuando la muestra se toma de superficie de la amígdala con un hisopo.

De forma interesante, en los sujetos control se detectó únicamente microbiota flora normal no patógena. Este dato puede ser explicado porque en este trabajo se incluyeron cuidadosamente solo sujetos control que no tenían antecedentes de amigdalitis de repetición y que eran mayores de 18 años, lo cual sobrepasa el período de riesgo para presentar amigdalitis recurrente. Además, el método de toma de muestra de los sujetos control fue solo por raspado superficial de amígdalas con hisopo, lo que podría omitir las bacterias intracelulares en capas más profundas o

aquellas que se encuentren en criptas profundas. No se tomaron biopsias de los controles por consideraciones éticas.

Todos nuestros casos fueron pacientes pediátricos (media de edad, 5 años), mientras que los controles fueron todos mayor de 18 años (media de edad, 28 años). Se incluyeron sujetos control de mayor edad para minimizar el riesgo inmunogenético de presentar amigdalitis recurrente en el futuro.

En estudios de casos y controles, las únicas variables deben ser las que están bajo estudio y se debe evitar el manejo diferencial entre el control y los grupos de casos. Sin embargo, debido a razones éticas, no se realizaron biopsias en los controles. Los cultivos extraídos de las amígdalas facilitaron la detección de más especies bacterianas, incluyendo especies patógenas potenciales. Si sólo consideramos los cultivos del raspado de amígdalas con hisopo, al comparar con los sujetos control, los porcentajes de potenciales patógenos son más bajos, pero igualmente significativos.

Sobre todo, las especies bacterianas patógenas más frecuentes fueron *S. aureus* y *H. influenzae*, lo cual es consistente con lo encontrado en la literatura (22, 23).

El impacto de la formación de biopelícula ha sido previamente reportado en un estudio de casos y controles, en el cual incluyeron 20 pacientes con amigdalitis recurrente y 20 pacientes sin antecedente de amigdalitis en los últimos 2 años. La prevalencia de la biopelícula, analizada por microscopía electrónica, fue significativamente más alta en la población con amigdalitis recurrente (24).

De manera similar, otro estudio, en donde *H. influenzae* fue el patógeno más frecuentemente encontrado en pacientes con amigdalitis, propone que la formación

de biopelícula podría tener un rol etiopatogénico importante en reacciones inflamatorias crónicas de las mucosas (23).

En este escenario, la presencia de *S. aureus* y *H. influenzae*, especialmente en biopelículas, podrían estar involucrados en el desarrollo de una enfermedad inflamatoria amigdalina y un antecedente genético proinflamatorio, podría aumentar dicho riesgo.

La respuesta inmune regulada genéticamente parece tener un involucro crucial en la intensidad de daño a las amígdalas (25). Encontramos una asociación entre la presencia del alelo *IL1B31\*C* (en homocigotos y heterocigotos) y el desarrollo de amigdalitis recurrente. Cuando añadimos el factor bacteriano (*S. aureus* y *H. Influenzae*) además de la producción de biopelícula, la RM se eleva al infinito.

Con estos resultados, nuestra hipótesis es que bajo una respuesta inflamatoria condicionada genéticamente (por el alelo *IL1B31\*C*) y la infección por *S. aureus* y *H. influenzae*, condicionan a se presente amigdalitis recurrente. En nuestro conocimiento, ningún otro estudio ha mostrado esta asociación.

Uno de pocos estudio que ha analizado la presencia de polimorfismo del receptor Tool-like (TLR) 4-T399I, está asociado con una reducción a la mitad de ser portador de *H. Influenzae* (RM = 0.38, 95% IC = 0.15 a 0.96, p = 0.038); resaltando que la genética de la respuesta inmune del hospedero puede estar involucrada importantemente en la susceptibilidad a presentar infecciones comunes y enfermedad amigdalina (26).

La principal limitación de este estudio, es que no se incluyeron medios de cultivo para bacterias anaeróbicas y éstas podrían estar involucradas en la amigdalitis recurrente.

## **CAPITULO X**

### **CONCLUSIÓN**

Nuestros resultados sugieren que la presencia del alelo *IL1B31\*C* puede ser un factor de riesgo para presentar amigdalitis, especialmente cuando especies como *S. aureus* o *H. Influenzae* están presentes. Si este hallazgo es confirmado en otra población distinta a la mexicana, podría ser utilizado para detectar pacientes en riesgo para amigdalitis de repetición.

## CAPITULO XI

### ANEXOS

**Tabla 1. Evaluación microbiológica de las amígdalas extraídas y del hisopado de superficie amigdalina de todos.**

No. de microorganismos aislados	Amígdalas extraídas n=138 (%)	Hisopado amigdalino n=138 (%)
1	69 (50.0)	70 (50.7)
2	37 (26.8)	26 (18.8)
3	12 (8.7)	7 (5.1)
<b>Microorganismo aislado</b>		
Microbiota Normal	20 (17.4)	35 (25.4)
<i>Staphylococcus aureus</i>	67 (48.6)	56 (40.6)
<i>Haemophilus influenzae</i>	44 (31.9)	31 (22.5)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	21 (15.2)	16 (11.6)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 (7.2)	10 (7.2)
<i>Enterobacter cloacae</i>	5 (3.6)	4 (2.9)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	5 (3.6)	2 (1.5)
<i>Citrobacter freundii</i>	4 (2.9)	6 (4.3)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4 (2.9)	4 (2.9)
<i>Streptococcus hemolítico Grupo B</i>	4 (2.9)	3 (2.2)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3 (2.2)	1 (0.7)
<i>Candida spp.</i>	2 (1.5)	2 (1.5)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 (0.7)	2 (1.5)
<i>Pantoea agglomerans</i>	1 (0.7)	2 (1.5)
<i>Burkholderia cepacia</i>	1 (0.7)	1 (0.7)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2 (1.5)	0 (0.0)
<i>Serratia plymuthica</i>	1 (0.7)	0 (0.0)
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	1 (0.7)	0 (0.0)
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1 (0.7)	0 (0.0)

**Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas de *TNFA-308G/A* y *IL1B-31C/T* en amigdalitis recurrente y sujetos controles.**

	Frecuencia genotípica n (%)			Frecuencia alélica		Odds ratio (95% CI)	P
	CC	CT	TT	C	T		
<b><i>IL1B-31C/T</i></b>							
Casos (n=138)	56 (40.6)	78 (56.5)	4 (2.9)	0.69	0.31	4.03 (1.27-14.27)	0.013
Controles (n=195)	81 (42.6)	93 (48.9)	21 (11.1)	0.65	0.35		
<b><i>TNFA-308G/A</i></b>							
Casos (n=138)	0 (0.0)	21(15.2)	117 (84.8)	0.08	0.92		NS
Controles (n=195)	2 (1.1)	54 (28.4)	139 (73.2)	0.15	0.85		

**Tabla 3. Odds ratios (OR) con 95% de intervalo de confianza (ICs) para factores de riesgo.**

	<i>IL1B-31</i> *C	<i>IL1B-31</i> *C+S. <i>aureus</i>	<i>IL1B-31</i> *C + <i>S.</i> <i>aureus</i> productor de biopelícula	<i>IL1B-31</i> *C+ <i>H.</i> <i>influenzae</i>	<i>IL1B-31</i> *C + <i>H.</i> <i>influenzae</i> productor de biopelícula
Casos (n=138)	134	67/134	38/52	34/134	15/25
Controles (n=195)	174	0/174	0	0	0
OR (95% IC), P	4.03(1.27- 14.27), 0.013	∞ (39.21- ∞), 0.0	∞(14.436-∞), 0.0	∞ (12.387- ∞), 0.0	∞ (4.46-∞), 0.0

## CONSENTIMIENTOS INFORMADOS

### ESCRITO PARA EL ASENTIMIENTO PARA MENORES DE 12 AÑOS

**"SE ENCUENTRAN LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL RECEPTOR TOLL-LIKE 4 (TLR4 ASP299GLY), DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL - ALFA (TNF-A 308 G/A), DE LA INTERLEUCINAS -1B (IL1B-31 C/T), 8 (IL8-251A/T), Y 10 (10-1082 G/A) ASOCIADOS AL DESARROLLO DE ENFERMEDAD INFLAMATORIA AMIGDALINA"**

Hola, mi nombre es DR. BALTAZAR GONZALEZ ANDRADE y yo soy un investigador de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la UANL, que está tratando de aprender si los genes de las personas influyen en las infecciones de las anginas (amígdalas palatinas). Los genes son una parte de las células de tu cuerpo que se pasan de los padres a los hijos y hacen que las personas sean diferentes (color de ojos, de piel, altura, etc.)

*El motivo de este estudio es saber si ciertos cambios en estos genes producen que los niños tengan infecciones más frecuentes en las anginas o padezcan de anginas crecidas.*

*Se te pide estar en este estudio porque con tu participación podremos entender mejor porque unos niños se enferman más que otros.*

*Yo seré el responsable de este estudio y que se hará en el Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, que es el lugar en donde se revisan los oídos, la nariz y la garganta, de el Hospital Universitario "José Eleuterio González" y el Hospital Regional Materno Infantil de Alta Especialidad.*

*¿En qué vas a participar? Cuando se esté haciendo la cirugía para quitarte las anginas, se te tomará una muestra de sangre, que no te va a doler, esto es para estudiar tus genes.*

*Para mantener todo en privado (en secreto), tu nombre no será utilizado de las hojas en las que estarán la información que nos des. En lugar de tu nombre aparecerá un número secreto.*

*Tus padre (s) han dicho que está bien que participes en este estudio de investigación. Tu no tiene que estar en este estudio si no quieres. Puedes cambiar de opinión en cualquier momento antes de decirle a tu mamá, papá o a el Ayudante de Investigador o Investigador.*

\_\_\_ No, no quiero estar en este estudio.

\_\_\_ Si, quiero estar en este estudio.



## ESCRITO PARA EL ASENTIMIENTO PARA MENORES DE 12-14 AÑOS

### **"SE ENCUENTRAN LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL RECEPTOR TOLL-LIKE 4 (TLR4 ASP299GLY), DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL - ALFA (TNF-A 308 G/A), DE LA INTERLEUCINAS -1B (IL1B-31 C/T), 8 (IL8-251A/T), Y 10 (10-1082 G/A) ASOCIADOS AL DESARROLLO DE ENFERMEDAD INFLAMATORIA AMIGDALINA"**

*Los investigadores de Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León están realizando un estudio de investigación donde estamos tratando de aprender si los genes de las personas influyen en las infecciones de las anginas (amígdalas palatinas). Los genes son una parte de las células de tu cuerpo que se pasan de los padres a los hijos y hacen que las personas sean diferentes (color de ojos, de piel, altura, etc.)*

*El motivo de este estudio es saber si ciertos cambios en estos genes influyen para que los niños tengan infecciones más frecuentes en las anginas o padezcan de anginas crecidas.*

Se pide que los niños participen en este estudio porque estas infecciones se presentan más en niños que en adultos.

*Seré el responsable de este estudio: Dr. Baltazar González Andrade, Profesor de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, me podrán localizar en el teléfono 83-33-42-99 para cualquier duda o aclaración.*

El estudio se llevará a cabo en el Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, que es el lugar en donde se revisan los oídos, la nariz y la garganta, del Hospital Universitario "José Eleuterio González" y del Hospital Regional Materno Infantil de Alta Especialidad.

El estudio consiste en que cuando se esté haciendo la cirugía para quitarte las anginas, se te tomará una muestra de sangre, que no te va a doler, esto es para estudiar tus genes.

Toda la información personal que se te pregunte será confidencial (secreta) y tus padres no sabrán lo que contestes.

*Tu información se mantendrá en privado (en secreto).*

Sólo el investigador y tu sabrán las respuestas a las preguntas. Las únicas personas autorizadas a saber las respuestas son las personas que trabajan en este estudio.

*Tus padre (s) han dicho que está bien que participes en este estudio de investigación. Tu no tiene que estar en este estudio si no quieres. Puedes cambiar*





Declaración de la persona que lleva a cabo la discusión del Asentimiento.

1. He explicado todos los aspectos de la investigación al menor en la medida de su capacidad de entender.
2. He respondido a todas las preguntas del sujeto en relación con esta investigación.
3. El menor acepta participar en la investigación.
4. Creo que la participación del menor es voluntaria.
5. El Médico y el personal del estudio aceptan respetar el disentimiento físico o emocional del sujeto en cualquier momento de la investigación cuando dicho disentimiento sea relativo a algo que se hace únicamente con los fines de esta investigación.

\_\_\_\_\_  
*Fecha*

\_\_\_\_\_  
*Firma de la persona que lleva Acabo el asentimiento.*

\_\_\_\_\_  
*Firma*

## ESCRITO PARA EL ASENTIMIENTO PARA MAYORES DE 15 AÑOS

### 1.- CONSENTIMIENTO INFORMADO

**"SE ENCUENTRAN LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL RECEPTOR TOLL-LIKE 4 (TLR4 ASP299GLY), DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL - ALFA (TNF-A 308 G/A), DE LA INTERLEUCINAS -1B (IL1B-31 C/T), 8 (IL8-251A/T), Y 10 (10-1082 G/A) ASOCIADOS AL DESARROLLO DE ENFERMEDAD INFLAMATORIA AMIGDALINA"**

*Su hijo(a) ha sido invitado(a) a participar en este estudio de investigación. Este documento tiene toda la información sobre este estudio. Tómese el tiempo necesario para que lo lea y haga cualquier pregunta que pudiera tener a su médico o personal del estudio de investigación.*

### 2.- LOS INVESTIGADORES

*Seré el responsable de este estudio: Dr. Baltazar González Andrade, Profesor de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello del Hospital Universitario "José Eleuterio González", me podrán localizar en el teléfono 83-33-42-99 para cualquier duda o aclaración.*

### 3.- ACERCA DE ESTE ESTUDIO.

Las infecciones en las anginas (amígdalas palatinas) o tener anginas crecidas es algo muy frecuente en los niños y una razón muy común por la que se dan antibióticos. Cuando los niños se enferman muchas veces al año o sus anginas ya son muy grandes, se pueden operar para quitarles las anginas. Aún no se sabe porque unos niños se enferman más que otros por lo que se han estudiado las bacterias que infectan las anginas y otros factores como la alergia pero esto no explica la pregunta. Así que lo que buscamos estudiar son los genes, los genes son una parte de las células de tu cuerpo que se pasan de los padres a los hijos y hacen que las personas sean diferentes (color de ojos, de piel, altura, etc.)

### 4.- ¿PARA QUE SE LLEVA A CABO ESTE ESTUDIO?

*El propósito de este estudio es saber si ciertos cambios en estos genes influyen para que los niños tengan infecciones más frecuentes en las anginas o padezcan de anginas crecidas.*

*Los datos de esta investigación serán utilizados para tener a futuro una manera de saber porque unos niños se enferman más que otros.*

### 5.- ¿CUÁLES SON LOS REQUISITOS PARA PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

Para participar en este estudio se incluirán a todos los niños entre 2 y 15 años de edad que acudan al Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, que es el lugar en donde se revisan los oídos, la nariz y la garganta, del Hospital Universitario "José Eleuterio González" o del Hospital Regional Materno Infantil de

Alta Especialidad, quienes tengan indicado quitarles las anginas y además quieran participar en el estudio con el permiso de los padres o tutores.

#### **6.- ¿QUÉ SE ME PEDIRÁ QUE HAGA?**

Si su hijo(a) está programado(a) para cirugía de anginas y usted se ofrece como voluntario para que su hijo(a) participe en este estudio, sólo le pedirá que lleve a su hijo(a) a su cirugía, estando en quirófano se le tomará una muestra de sangre de la vena para estudiar los genes.

*Su participación será en ese único día.*

#### **7.- ¿QUÉ ME PODRÍA PASAR POR PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?**

A su hijo(a) se le realizará una cirugía que no es parte de este estudio, y esos riesgos tendrán que ser explicados por su médico tratante. No hay riesgos que veamos a futuro asociados con este estudio.

#### **8.- ¿QUIÉN PAGARÍA LAS CUENTAS DEL HOSPITAL O DEL MÉDICO EN CASO DE QUE ME PASE ALGO?**

*Es poco probable que la participación en este proyecto dará como resultado un daño a los participantes. Si existe una lesión secundaria al el estudio, el sujeto deberá notificar al Investigador Principal para que reciba la atención médica necesaria en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”. Los gastos relacionados con la cirugía de las anginas, así como las posibles complicaciones de la misma serán cubiertas por los padres de los niños participantes, ya que la cirugía no es parte del estudio.*

#### **9.- ¿QUÉ BENEFICIOS TENGO POR PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?**

Al participar en este estudio no recibirá beneficios, pero ayudará a que otros niños a futuro se puedan beneficiar con los resultados de este estudio.

#### **10.-¿QUÉ OTRAS OPCIONES DE TRATAMIENTO TENGO EN CASO DE NO ACEPTAR PARTICIPAR EN EL ESTUDIO?**

Este estudio no ofrece una opción de tratamiento, por lo que las opciones en cuanto al tratamiento de las anginas tendrán que ser platicadas con su doctor tratante.

#### **11.- ¿CÓMO PROTEGERÁ MI PRIVACIDAD?**

Para cuidar la confidencialidad (que la información de su hijo(a) se mantenga en secreto), no se guardarán los nombres, ya que estos serán cambiados por números y de esta manera identificar las muestras que se tomen.

#### **12.- ¿TENDRE ALGO QUE PAGAR DURANTE LA INVESTIGACIÓN?**

Para participar en este estudio no habrá costo. Es importante aclarar que la cirugía de las anginas no son parte de este estudio.

#### **13.- ¿RECIBIRÉ ALGUN PAGO O INCENTIVO POR MI PARTICIPACIÓN?**

No recibirá ningún pago o incentivo por formar parte del estudio.

#### **14.- ¿QUÉ VA A PASAR SI ME ARREPIENTO DE PARTICIPAR?**

La participación de su hijo(a) en este estudio es voluntaria. Como participante, usted puede negarse a participar en cualquier momento. Para sacar a su hijo(a) del estudio por favor hablar al 83-33-42-99 con el Dr. Baltazar González Andrade

#### **15.- SI TENGO PREGUNTAS, ¿AQUIEN PUEDO LLAMAR O COMUNICARME?**

Si usted tiene alguna pregunta acerca del estudio, por favor hable al 83-33-42-99 al Hospital Universitario "José Eleuterio González" con el Dr. Baltazar González Andrade

*1.- Preguntas del estudio, llamar a: 83-33-42-99 al Hospital Universitario "José Eleuterio González" con el Dr. Baltazar González Andrade*

*2.-En caso de daños llamar a : 83-33-42-99 al Hospital Universitario "José Eleuterio González" con el Dr. Baltazar González Andrade 3.-En caso de dudas de mis derechos como paciente comuníquese con:*

*Dr. José Gerardo Garza Leal*

*Presidente del Comité de Ética*

*Teléfono de Contacto: 8329-4050 ext 2870-74*

*Recuerde que este proyecto ha sido revisado y aprobado por el Comité de Ética y el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina y del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad de Autónoma de Nuevo León.*

*Se le ha dado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas a su satisfacción. Si firma abajo indica que está de acuerdo para participar como voluntario en este estudio de investigación.*

## PARTE 2: FIRMAS QUE DOCUMENTAN EL ACUERDO

### 16.- ACUERDO

*Su consentimiento para participar en la investigación será voluntario e informado. Si usted está de acuerdo en participar y si sus preguntas han sido contestadas a su entera satisfacción, usted deberá firmar esta forma. Una vez firmada la forma, usted está de acuerdo en participar en este estudio. En caso de que usted se rehúse a participar, usted podrá retirarse sin pérdida de alguno de sus beneficios médicos.*

*Una vez que usted haya consentido, usted aún tendrá el derecho de retirarse en cualquier momento sin que esto afecte su atención médica. Para retirarse, lo único que usted deberá hacer es informar a su médico de su decisión.*

*Se le ha proporcionado una copia de esta forma para quedársela y para que haga referencia a ella cuando sea necesario.*

_____	_____	_____
<i>Fecha</i>	<i>Firma de la Sujeto</i>	<i>Nombre en letra de molde</i>
_____	_____	_____
<i>Fecha molde</i>	<i>Firma del Primer Testigo</i>	<i>Nombre en letra de</i>

\_\_\_\_\_  
*Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio Dirección*

_____	_____	_____
<i>Fecha</i>	<i>Firma del Segundo Testigo</i>	<i>Nombre en letra de molde</i>

\_\_\_\_\_  
*Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio Dirección*

### II. ASEGURAMIENTO DEL INVESTIGADOR O DEL MIEMBRO DEL EQUIPO

*He discutido lo anterior con esta persona. A mi más leal saber y entender, el sujeto está proporcionando su consentimiento tanto voluntariamente como de una manera informada, y él/ella posee el derecho legal y la capacidad mental suficiente para otorgar este consentimiento.*

_____	_____	_____
<i>Fecha</i>	<i>Firma de la Persona que Obtuvo el Consentimiento/Investigador Principal</i>	<i>Nombre en letra de molde</i>

## BIBLIOGRAFÍA

1. McKerrow WS. Recurrent tonsillitis. American family physician. 2002;66(9):1735-6.
2. Baugh RF, Archer SM, Mitchell RB, Rosenfeld RM, Amin R, Burns JJ, et al. Clinical practice guideline: tonsillectomy in children. Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 2011;144(1 Suppl):S1-30.
3. Prim MP, de Diego JI, Larrauri M, Diaz C, Sastre N, Gavilan J. Spontaneous resolution of recurrent tonsillitis in pediatric patients on the surgical waiting list. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 2002;65(1):35-8.
4. Bisno AL. Are cephalosporins superior to penicillin for treatment of acute streptococcal pharyngitis? Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2004;38(11):1535-7.
5. McIsaac WJ, Goel V, To T, Low DE. The validity of a sore throat score in family practice. CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne. 2000;163(7):811-5.
6. Group ESTG, Pelucchi C, Grigoryan L, Galeone C, Esposito S, Huovinen P, et al. Guideline for the management of acute sore throat. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2012;18 Suppl 1:1-28.
7. Glezen WP, Clyde WA, Jr., Senior RJ, Sheaffer CI, Denny FW. Group A streptococci, mycoplasmas, and viruses associated with acute pharyngitis. Jama. 1967;202(6):455-60.
8. Glusman G, Lancet D. Visualizing large-scale genomic sequences. IEEE engineering in medicine and biology magazine : the quarterly magazine of the Engineering in Medicine & Biology Society. 2001;20(4):49-54.
9. Al-Mazrou KA, Al-Khattaf AS. Adherent biofilms in adenotonsillar diseases in children. Archives of otolaryngology--head & neck surgery. 2008;134(1):20-3.
10. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional

activation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997;94(7):3195-9.

11. Abdallah AN, Cucchi-Mouillot P, Biteau N, Cassaigne A, Haras D, Iron A. Analysis of the polymorphism of the tumour necrosis factor (TNF) gene and promoter and of circulating TNF-alpha levels in heart-transplant patients suffering or not suffering from severe rejection. European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics. 1999;26(4):249-55.

12. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. Annual review of immunology. 1989;7:625-55.

13. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. Nature. 2000;404(6776):398-402.

14. Furuta T, El-Omar EM, Xiao F, Shirai N, Takashima M, Sugimura H. Interleukin 1beta polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. Gastroenterology. 2002;123(1):92-105.

15. Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, El-Omar E, Hold G, Tijerina-Menchaca R, Maldonado-Garza HJ, et al. Role of the polymorphic IL-1B, IL-1RN and TNF-A genes in distal gastric cancer in Mexico. International journal of cancer. 2005;114(2):237-41.

16. Capper R, Canter RJ. Is the incidence of tonsillectomy influenced by the family medical or social history? Clinical otolaryngology and allied sciences. 2001;26(6):484-7.

17. Randel A. AAO-HNS Guidelines for Tonsillectomy in Children and Adolescents. American family physician. 2011;84(5):566-73.

18. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. Journal of clinical microbiology. 1985;22(6):996-1006.

19. Puig C, Marti S, Hermans PW, de Jonge MI, Ardanuy C, Linares J, et al. Incorporation of phosphorylcholine into the lipooligosaccharide of nontypeable

Haemophilus influenzae does not correlate with the level of biofilm formation in vitro. *Infection and immunity*. 2014;82(4):1591-9.

20. Mizrahi A, Cohen R, Varon E, Bonacorsi S, Bechet S, Poyart C, et al. Non typable-Haemophilus influenzae biofilm formation and acute otitis media. *BMC infectious diseases*. 2014;14:400.

21. Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, Mendoza-Ibarra SI, Flores-Gutierrez JP, Maldonado-Garza HJ, Perez-Perez GI. Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer. *BMC cancer*. 2007;7:70.

22. Zautner AE, Krause M, Stropahl G, Holtfreter S, Frickmann H, Maletzki C, et al. Intracellular persisting Staphylococcus aureus is the major pathogen in recurrent tonsillitis. *PloS one*. 2010;5(3):e9452.

23. Galli J, Calo L, Ardito F, Imperiali M, Bassotti E, Fadda G, et al. Biofilm formation by Haemophilus influenzae isolated from adeno-tonsil tissue samples, and its role in recurrent adenotonsillitis. *Acta otorhinolaryngologica Italica : organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale*. 2007;27(3):134-8.

24. Woo JH, Kim ST, Kang IG, Lee JH, Cha HE, Kim DY. Comparison of tonsillar biofilms between patients with recurrent tonsillitis and a control group. *Acta otolaryngologica*. 2012;132(10):1115-20.

25. Todorovic MM, Zvrko EZ. Immunoregulatory cytokines and chronic tonsillitis. *Bosnian journal of basic medical sciences*. 2013;13(4):230-6.

26. Liadaki K, Petinaki E, Skoulakis C, Tsirevelou P, Klapsa D, Germanis AE, et al. Toll-like receptor 4 gene (TLR4), but not TLR2, polymorphisms modify the risk of tonsillar disease due to Streptococcus pyogenes and Haemophilus influenzae. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2011;18(2):217-22.