

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

REPORTE DEL SERVICIO SOCIAL
POR ACTIVIDADES RELACIONADAS CON LA PROFESIÓN

**Efecto de la modulación de HIF-1 α en la expresión de IL-17 en
un modelo murino de Inflamación Alérgica Pulmonar**

QUE PRESENTA LA ALUMNA

Diana Ventura Maqueda

Matrícula: 2152031226

ASESORES



Dra. Guillermina J. Baay Guzmán
Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas
del Hospital Infantil de México "Federico Gómez"

Cédula profesional: 7771726

Asesora Externa



M. en C. Germán Castro Mejía
Profesor Titular C No. Ecón.:23759
UAM-Xochimilco
Asesor Interno

Ciudad de México, noviembre 2022.

Resumen

El asma es una enfermedad inflamatoria de las vías aéreas la cual afecta a millones de personas en el mundo considerada un problema de salud pública mundial por la OMS y entender mejor la fisiopatología de esta enfermedad sigue siendo una prioridad. En pacientes con asma se ha observado un incremento en la expresión de IL-17A e IL-17F (isoformas de IL-17) tanto en asma moderada como severa y se ha demostrado en otro estudio que el factor de transcripción Inducible en Hipoxia 1 alfa (HIF-1alfa) regula transcripcionalmente a ROR γ t que es el factor de transcripción de la IL-17, favoreciendo así la respuesta Th17, además se cuenta con evidencias de que HIF-1 regula procesos de inflamación. La descripción entre la regulación positiva de la respuesta Th17 a través de HIF-1 contribuirá de manera importante en el conocimiento de la fisiopatogenia de la alergia. Por lo que para poder entender mejor esta enfermedad se evaluó el efecto de la inhibición de HIF-1 α en la expresión de IL-17 en tejido pulmonar mediante tinciones histopatológicas de H&E (infiltrado inflamatorio), PAS (producción de moco) e inmunohistoquímicas para las proteínas de HIF-1 α e IL-17 que se analizaron de forma cuantitativamente mediante patología digital y posteriormente se realizaron los estadísticos.

Palabras clave: Asma, IL-17, HIF-1 α , inhibición e Inflamación alérgica.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Marco institucional | 4 |
| Introducción | 5 |
| Ubicación geográfica | 7 |
| Objetivo general | 7 |
| Especificación y fundamento de las actividades desarrolladas | 7 |
| Impacto de las actividades del servicio social | 8 |
| Aprendizaje y habilidades obtenidas durante el desarrollo del servicio social | 8 |
| Referencias | 14 |

MARCO INSTITUCIONAL

En Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG), la investigación científica y tecnológica, constituye una función sustantiva realizada en un marco normativo adaptado a las características del fomento y desarrollo de las actividades de investigación, con una política científica institucional que garantiza la eficacia y eficiencia para la investigación y la calidad, propiciando en el HIMFG un reconocimiento general de la cultura de la investigación y de su proyección en la docencia, que revalorizan al HIMFG como un instituto médico de excelencia al servicio de la sociedad mexicana.

Las actividades en el HIMFG y en UAM-Xochimilco están enfocadas a futuras investigaciones para el desarrollo de la ciencia y del país, logrando así el acercamiento y dominio de las posibles actividades profesionales actuales y a futuro con el compromiso de formar profesionales y futuros investigadores.

Por ello, las actividades en el servicio social están relacionadas a trabajos de investigación científica con el fin de aplicar tanto los conocimientos adquiridos durante la licenciatura como nuevos conocimientos, tales como:

- Evaluación de tejidos por medio de microfotografías
- Uso de software empleado en patología digital
- Construcción de bases de datos
- Análisis de datos
- Biología molecular
- Inmunología

INTRODUCCIÓN

El asma alérgica es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas, que afecta a más de 300 millones de personas en el mundo y es considerada un problema de salud pública mundial por la OMS (1), no solo por el costo económico sino por la mala calidad de vida de estos pacientes por lo que entender mejor la fisiopatología de esta enfermedad sigue siendo una prioridad.

La alergia tradicionalmente se define como una enfermedad multifactorial (2;3), en la que pueden participar aspectos como la dieta materno-infantil, la contaminación ambiental, infecciones respiratorias y cambios de temperatura entre otros (4), sin embargo, la predisposición genética o atopia es el aspecto más importante para el desarrollo de esta enfermedad. Los individuos susceptibles, al estar expuestos a los alérgenos desarrollan una hipersensibilidad mediada por IgE con una respuesta de tipo Th2 (6). Pero se ha observado en diversos estudios clínicos y experimentales que sugieren que el asma es mucho más heterogénea y compleja que el paradigma Th2.

Con esta perspectiva la respuesta Th17 cada vez toma mayor relevancia.

La interleucina IL-17 es la citocina más representativa de los linfocitos Th17. En sus inicios se creía que la expresión de IL-17 estaba asociada solo a una inflamación no atópica, no eosinofílica e IgE independiente, y a una inflamación neutrofílica predominantemente (observada en procesos de asma severa) (5;6). Pero ahora se sabe que la IgE puede mediar el incremento de las células IL17+CD4+ en el pulmón (7), que ratones sensibilizados con OVA incrementan los niveles de mRNA de IL-17 en el tejido pulmonar reclutando neutrófilos (8) y que ratones deficientes de IL-17F tienen una disminución en la respuesta neutrofílica ante el alérgeno (9). Este reporte es sustentado con los hallazgos en la neutralización de IL-17 en modelos murinos, el grupo de Schnyder-Candrian S. reportó que la expresión de IL-17 es esencial en la sensibilización antigénica (10), en tanto Fogli L., et. al. observaron que la IL-17 media cambios epiteliales y además se identificó a CXCL5 y CXCL2 como los responsables del reclutamiento de los neutrófilos (11), por su parte el grupo de Chenuet P. concluyeron que la inactivación de IL-17A e IL-17F atenúa el asma alérgica en los ratones (12).

En pacientes con asma se ha observado un incremento en la expresión de IL-17A e IL-17F (isoformas de IL-17) tanto en asma moderada como severa (6), que el reto alérgico en sujetos asmáticos incrementa los niveles de IL-17F en lavados bronquioalveolares (13) y en esputo se observó que la neutrofilia era más frecuente en los casos con mayor severidad (14); por lo que la inflamación neutrofílica está asociada a la severidad del asma (15). Aunque en la mayoría de los reportes se asocia la IL-17 con los neutrófilos recientemente se demostró que esta citocina

también actúa en los eosinófilos induciendo la expresión de IL-1beta, IL-6, IL-8 y MIP-1alpha (16). Pero además el grupo de Wang YH en el 2010 utilizando un modelo de asma alérgica crónica, demostró que los linfocitos Th2 presentan una plasticidad en su fenotipo, teniendo la capacidad de producir IL-4 e IL-17 favoreciendo una heterogeneidad en el infiltrado leucocitario y la exacerbación del asma (17) Por lo que ahora se considera el asma como una enfermedad heterogénea compuesta por diferentes fenotipos.

Fujita J. y Cols demostraron en 2012 que las células del epitelio bronquial (que expresan el receptor de IL-33, "ST2") producen grandes cantidades de IL-17F en respuesta a IL-33, vía ST2-ERK1/2-MSK1 (18;19). Otro trabajo demostró que la IL-33 en presencia de la IL-17A exagera la hiperreactividad aérea y recientemente se ha demostrado que el factor de transcripción HIF-1 promueve la activación de la vía de señalización que controla la producción de IL-33.

Sin embargo, diversos estudios han demostrado que el factor de transcripción Inducible en Hipoxia 1 alfa (HIF-1 alfa) regula transcripcionalmente a ROR γ t que es el factor de transcripción de la IL-17, favoreciendo así la respuesta Th17, además de orquestar el balance de la respuesta Th17/Treg (20;21). Hace 15 años se empezó a evaluar el papel que tiene HIF-1 en procesos alérgicos, sin embargo, la relación con la respuesta Th17 ha sido someramente evaluada.

HIF-1 fue descrito en 1991 por el grupo de Semenza (22). Se ha reportado que regula la transcripción de más de 200 genes involucrados en procesos tan diversos como angiogénesis, eritropoyesis, metabolismo energético, glicólisis, apoptosis, crecimiento celular, sobrevivencia, movilidad celular, quimiotaxis, entre otras (23). Este factor es el principal regulador de la homeostasis del oxígeno y hasta hace unos 10 años se creía que se regulaba sólo en procesos de hipoxia (24). Sin embargo, se han generado evidencias de que HIF-1 es regulado en procesos de inflamación (25;26). Nuestro grupo de trabajo fue pionero en el estudio del papel de HIF-1 en la fisiopatología de asma, utilizando un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar (IAP), en donde reportamos que la expresión de HIF-1 correlaciona con la expresión de algunos de sus genes blanco, como VEGF (23) CCL2 (26) y CXCL12 (28) correlacionando, además con el grado de severidad y con la remodelación del tejido pulmonar (27). Además, empleando ratones "knock out" inducibles de HIF-1, confirmamos que este es necesario para el establecimiento de la enfermedad. Así mismo reportamos que los niveles de este factor transcripcional incrementan en pacientes alérgicos expuestos al reto alérgico (29).

Sin embargo, hasta el momento no se tienen estudios de la participación de HIF-1 en la regulación positiva de la respuesta Th17 en la inflamación alérgica pulmonar.

UBICACIÓN GEOGRÁFICA

El servicio social se realizará en modalidad a distancia en conjunto con el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG) en la Unidad de Investigación en enfermedades Oncológicas (UIEO).

OBJETIVO GENERAL

Contribuir en la recopilación de datos y en el análisis estadístico para poder evaluar el efecto de la modulación de HIF-1 α enfocado en la expresión de IL-17 aplicado en un modelo murino de asma.

ESPECIFICACIÓN Y FUNDAMENTO DE LAS ACTIVIDADES DESARROLLADAS

Se realizaron actividades adicionales a las propuestas, como:

- Asistencia virtual a seminarios semanales organizados por la Unidad de Investigación en Enfermedades Hemato-Oncológicas.
- Curso utilidad de la tecnología de microarreglos de tejidos y patología digital para la búsqueda de biomarcadores de cáncer: Aplicación en investigación y asistencia.

Estas actividades complementarias se tomaron con el objetivo de tener una mayor comprensión del proyecto.

Retomando las actividades planteadas, el análisis estadístico se realizó con muestras de tejido pulmonar provenientes de un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar (IAP) las cuales fueron procesadas bajo técnicas de tinciones histológicas e inmunohistoquímicas.

En los diagnósticos de patología actuales la mayoría se basa únicamente en la opinión subjetiva de los patólogos, por lo que existe una clara necesidad de una evaluación cuantitativa basada en imágenes mediante patología digital, las cuales brindan una visión más amplia de la fisiopatogenia de las enfermedades y su efecto en los tejidos debido a que nos permite preservar la arquitectura del tejido.

En los últimos años, se han propuesto muchos enfoques de investigación para sistemas de análisis cuantitativo asistidos por computadora para la evaluación de tejidos, evaluación de la morfología nuclear y soporte visual para un análisis más eficiente. En las imágenes, con ayuda del software Aperio ImageScope, se realizó un marcaje en el área pulmonar dividiéndolo por vasos y bronquios para cada uno de los grupos, se delimitó el área que se quería evaluar y posteriormente se procedió a realizar la base de datos. Este algoritmo tiene el propósito de medir el área y la intensidad de la tinción (30).

Una vez concluido se procede a exportar la información obtenida y a realizar los estadísticos correspondientes, el análisis estadístico sirve para reducir un conjunto de

datos a una forma comprensible e interpretable mediante el uso de técnicas matemáticas que ayudan a categorizar, ordenar y manipular dicha información y en diversos contextos constituye un insumo importante para la toma de decisiones (31).

IMPACTO DE LAS ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL

La importancia de entender la fisiopatogenia del asma nos permitirá conocer los diferentes aspectos que intervienen en la enfermedad, la cual nos ayudará a proponer terapias alternativas para el asma de difícil control o bien en un futuro poder pensar en un tratamiento que dé como resultado el control absoluto de la enfermedad.

El recopilar, ordenar datos y realizar el correcto procesamiento de los mismos, resulta de suma importancia para la organización del conocimiento y en particular de este proyecto.

Las actividades realizadas para el avance del desarrollo de este proyecto son:

- Organización de las imágenes digitalizadas por medio de un Aperio, Leica a 40x
- Marcaje por medio del software Aperio Image Scope en las imágenes digitalizadas del tejido pulmonar
- Transferencia de datos del software Aperio Image Scope a Excel
- Organización de los datos por grupos en hojas de Excel
- Cálculos estadísticos
- Colaboración con la Interpretación de los datos

APRENDIZAJE Y HABILIDADES OBTENIDAS DURANTE EL DESARROLLO DEL SERVICIO SOCIAL

Durante el desarrollo del servicio, con ayuda del curso que anteriormente se mencionó, adquirí el conocimiento teórico de la técnica de inmunohistoquímica y sus aplicaciones, esta técnica nos permite hacer una identificación de componentes biomoleculares presentes en los tejidos por medio de reacciones antígeno-anticuerpo. La reacción antígeno-anticuerpo se visualiza añadiendo al anticuerpo una enzima (peroxidasa o fosfatasa alcalina) que se une a un cromógeno que será visualizado en luz visible (32), la cual es un apoyo en la evaluación de la fisiopatogenia de distintas enfermedades. Además, comprendí los principios de dos tinciones histológicas que son utilizadas en la mayoría de las células y matrices extracelulares, dependiendo de lo que se desee observar es la tinción que será utilizada.

Las tinciones que resultan de interés para este proyecto son:

- **HYE (Hematoxilina y Eosina)**

Se basa en la combinación de una sustancia (hematoxilina) y el colorante ácido eosina el cual permite una visión muy detallada del tejido.

- **PAS (Periodic Acid-Schiff)**

Basada en la oxidación de los tejidos mediante el ácido peryódico para incrementar el número de grupos carbonilos (aldehídos o cetonas) presentes en ellos para posteriormente tratar la muestra con el reactivo de Schiff que reacciona con dos grupos aldehídicos contiguos dando lugar a una coloración rojo-púrpura característica, en la Fig. 1 se pueden observar una composición de estas dos tinciones.

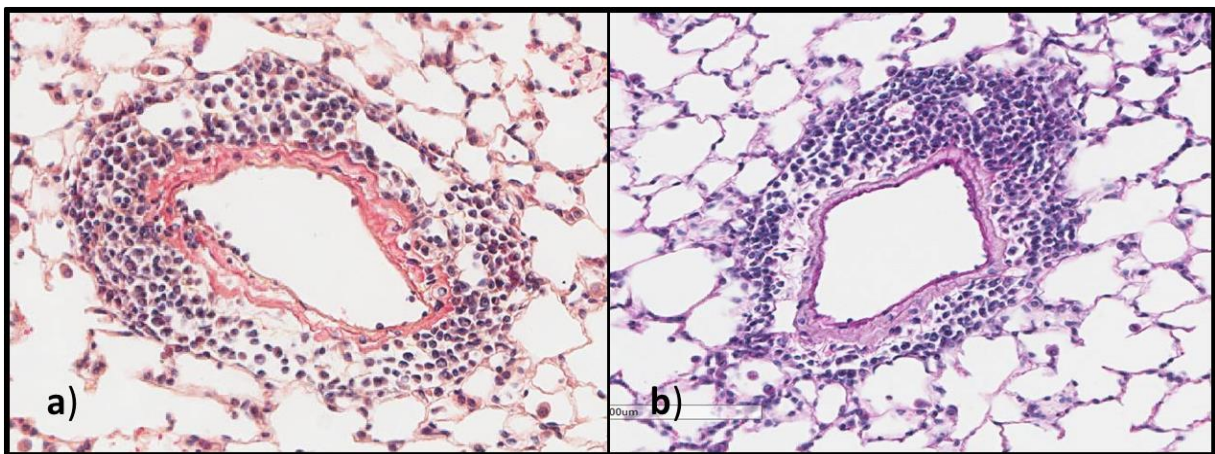


Fig. 1.- Tinciones histológicas: a) Vaso sanguíneo teñido con HYE en el que podemos observar las células inflamatorias (puntilleo) al rededor, b) Vaso sanguíneo teñido con PAS, dentro se observa niveles bajos de moco.

Otros conocimientos adquiridos y desarrollados fue la histopatología digital, proceso que comienza con la manipulación del equipo Aperio (Leica), este es un escáner de laminillas, el cual realiza un barrido sobre toda el área donde se encuentra el tejido para después revelar una imagen total digitalizada de la laminilla, cada escaneo se guarda directo en la nube del equipo y posteriormente puede realizarse la descarga de las imágenes desde su servidor (eSlide Manager), este proceso se realizó tanto para las tinciones histopatológicas (HYE y PAS) como para las inmunohistoquímicas (HIF-1 α e IL-17).

Análisis de los datos.

Una vez que se realizó la descarga de las imágenes se procede a hacer uso del software Aperio ImageScope, para obtener los datos cuantitativos se debe medir el área perivascular y peribronquial mediante un marcaje (Fig. 2).

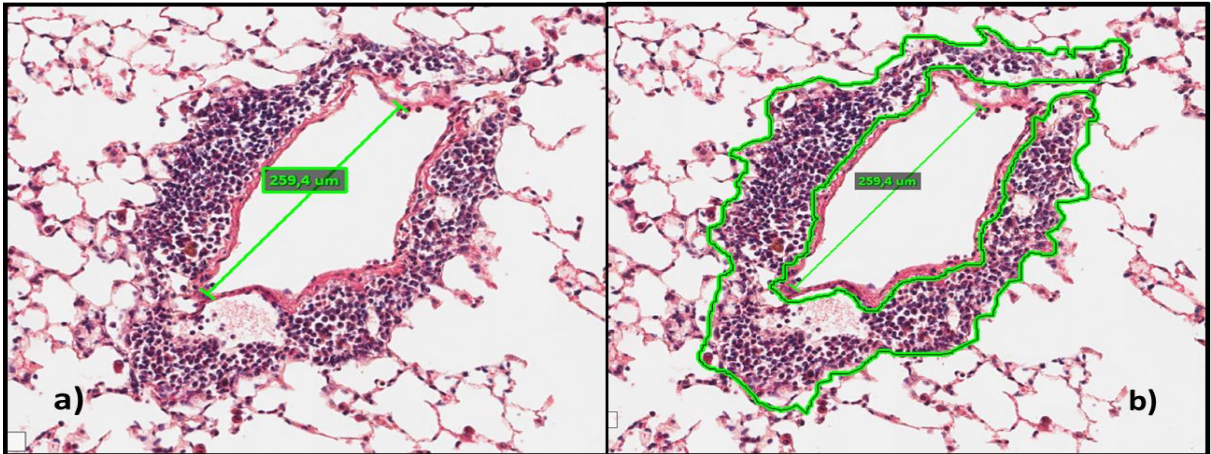


Fig. 2.- Proceso de marcaje en un vaso teñido con HYE mediante el software Aperio ImageScope

a) Selección longitudinal del vaso mediante regla en μm , b) Marcaje del área perivascular

Para HYE se evaluó el infiltrado inflamatorio de cada ratón para cada uno de los grupos, se seleccionaron de 3 a 5 vasos de entre $150\mu\text{m}$ a $300\mu\text{m}$ y bronquios de $150\mu\text{m}$ a $250\mu\text{m}$, en cuanto a PAS se evaluó la producción de moco, esta se obtuvo delimitando la luz del bronquio, en la que el programa de análisis cuantificó el área positiva de color fuchsia en μm^2 , analizando 3 a 5 bronquios con $150\text{-}300\mu\text{m}$ de diámetro.

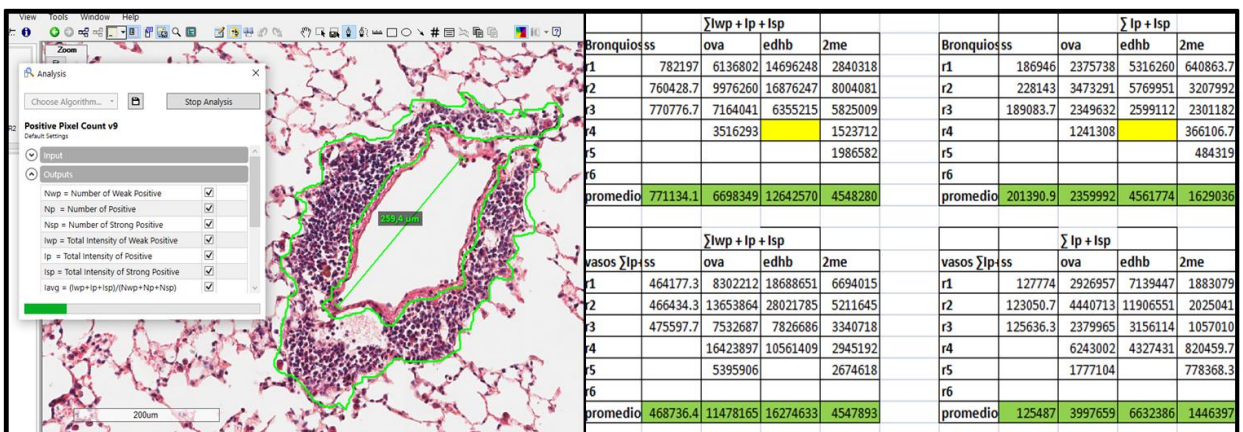


Fig. 3.- Análisis mediante el software Aperio ImageScope, recopilación y ordenamiento de los datos.

Para las inmunohistoquímicas tanto vasos como bronquios se marcaron de la misma forma, el análisis de la expresión de las proteínas HIF-1 α e IL-17 se realizó cuantificando la intensidad de la coloración café mediante el programa de análisis de imágenes (Image Scope, Aperio, Leica) (33), el cual determina automáticamente la intensidad del color café de las áreas marcadas del infiltrado inflamatorio arrojando tres intensidades (leve, moderada y fuerte) por área, de estas se realizó la sumatoria, obteniendo la intensidad total de cada proteína para vasos y bronquios. Los datos se analizaron utilizando el paquete GraphPad Prism® version 6.01 los cuales se expresaron en promedios \pm desviación estándar. Las comparaciones estadísticas se realizaron usando una prueba de ANOVA para la diferencia entre grupos.

Resultados

A continuación, se presenta una breve interpretación de los resultados obtenidos para cada una de las variables dependientes.

Con respecto al infiltrado inflamatorio, se realizó una gráfica para vasos y una para bronquios (Fig. 4), podemos observar que el grupo 2ME (inhibición de HIF-1 α) en comparación con el grupo alérgico (OVA) y el grupo EDHB (inductor de HIF-1 α) presentó una considerable reducción de células inflamatorias y destaca el valor obtenido del grupo 2ME para los vasos ya que es similar al obtenido para el grupo control.

Este comportamiento se presenta de manera similar para la producción de moco (fig. 5), lo que nos permite observar que hay una asociación directa entre la inhibición o inducción de HIF-1 α con respecto a la inflamación o a la producción de moco.

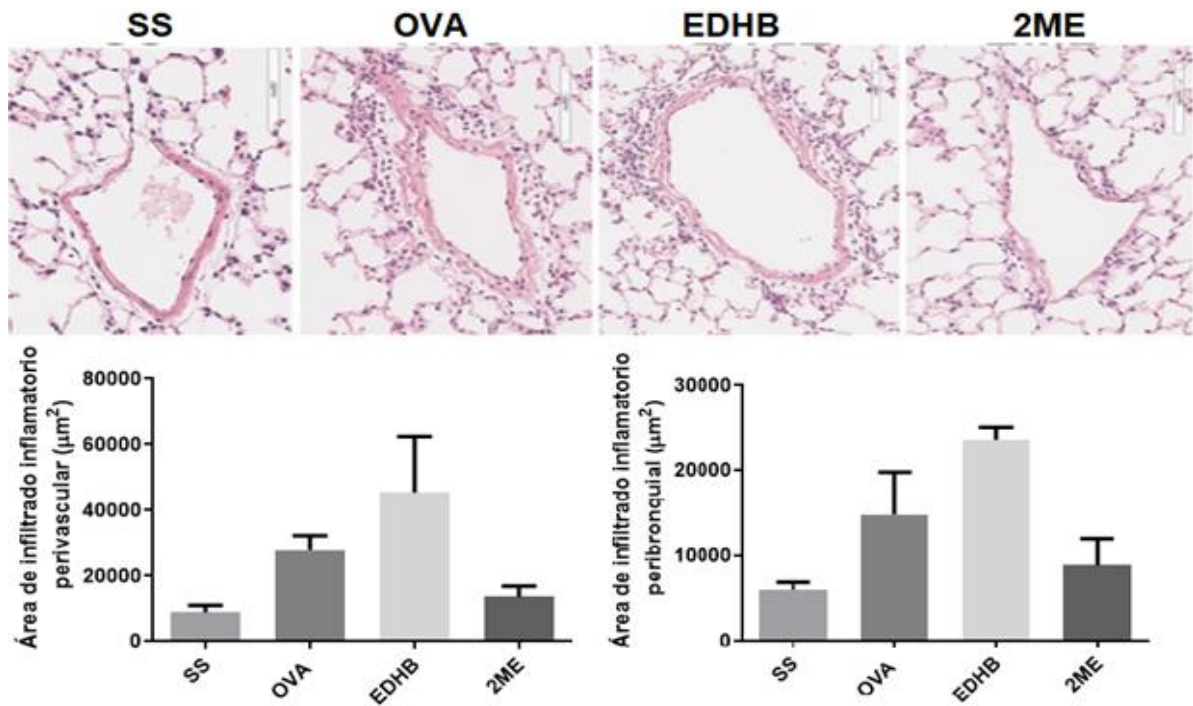


Fig. 4.- Evaluación de la inflamación en bronquios y vasos de tejido pulmonar expresada en μm^2 . En la parte superior se presentan microfotografías representativas de cada uno de los grupos y en la parte inferior gráficos correspondientes al infiltrado inflamatorio para vasos y bronquios.

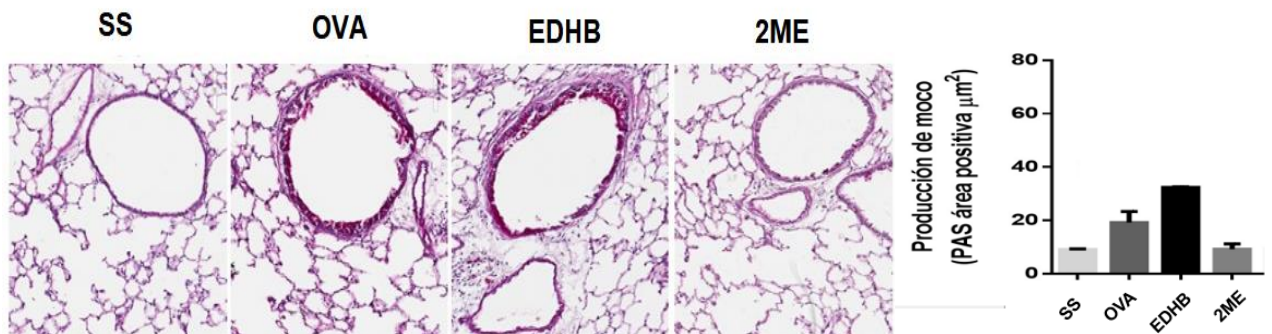


Fig. 5.- Evaluación de la producción de moco en tejido pulmonar. a) Micrografías representativas de la producción de moco, en el grupo control se muestra como SS, los ratones alérgicos se identifican como OVA, los ratados con OVA+ el inhibidor de HIF-1 α como EDHB, finalmente al grupo alérgico que recibió el inhibidor 2ME. b) A la derecha se muestra la producción cuantitativa total de moco expresada en un gráfico.

De acuerdo al gráfico de la (Fig. 6) la relación entre el factor de transcripción (HIF-1 α) y la citocina (IL-17), la inducción de HIF-1 α (EDHB) muestra una mayor intensidad de la expresión de Interleucina 17, sin embargo, al ser inhibido HIF-1 α (2ME) la expresión se reduce.

Con relación a la gráfica de HIF-1 α (Fig. 7) podemos corroborar que la inhibición o inducción tiene un efecto en la inflamación, producción de moco y en la intensidad de la expresión de IL-17 ya que en el grupo 2ME la presencia de la expresión de HIF-1 α disminuye lo que nos permite respaldar que HIF-1 α si se encuentra inhibido en las muestras.

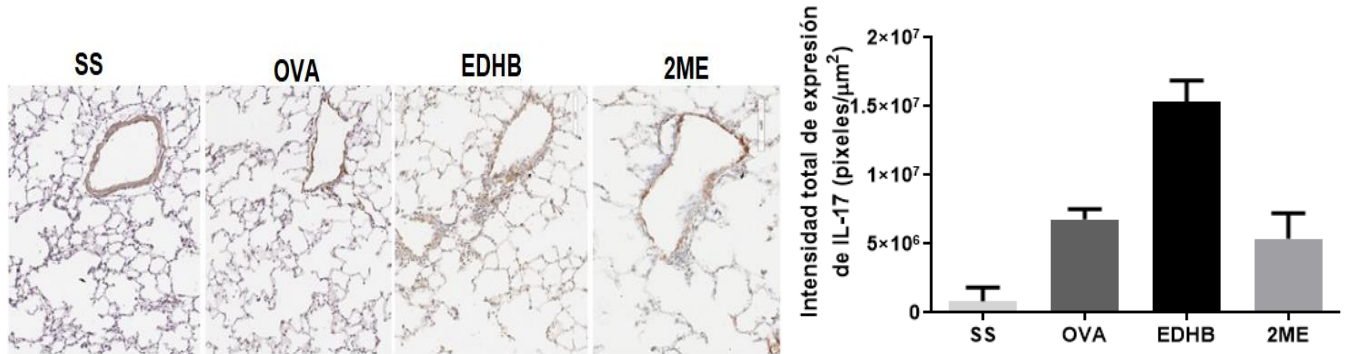


Fig 6.- Evaluación de la expresión de IL-17 en tejido pulmonar. A la izquierda se presentan micrografías representativas de vasos con células positivas en el núcleo.

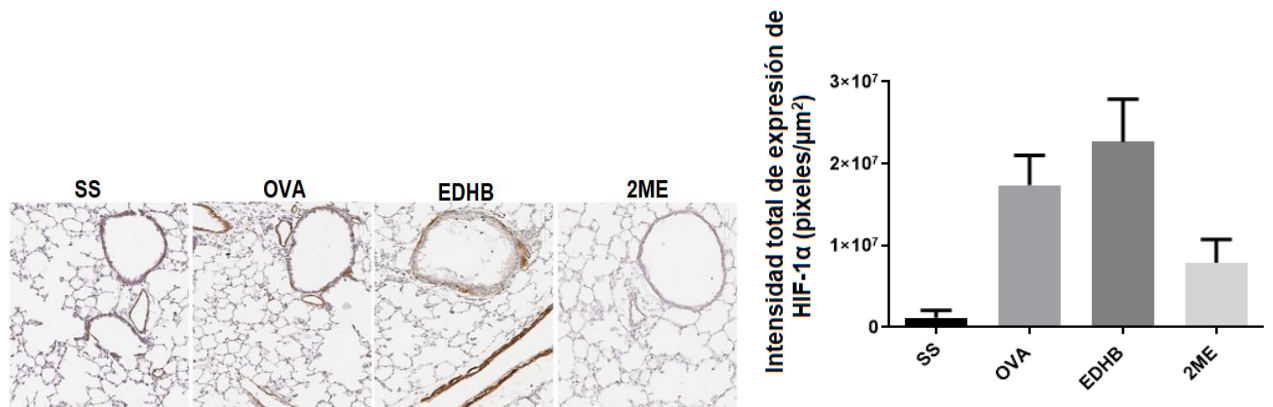


Fig 7.- Evaluación de la expresión de HIF-1 α en tejido pulmonar. A la izquierda se presentan micrografías representativas de vasos con células positivas alrededor.

A manera de conclusión, podemos corroborar que en efecto hay una relación entre el factor de transcripción HIF-1 α e IL-17, sin embargo, es importante el poder complementar estos resultados con otras pruebas moleculares que nos permitan ampliar el conocimiento sobre la forma en la que se están relacionando para la propuesta de futuras dianas terapéuticas.

REFERENCIAS

- (1) Eder, W., Ege, M. J., & Von Mutius, E. (2006). The asthma epidemic. *New England Journal of Medicine*, 355(21), 2226-2235.
- (2) Cookson, W. (1999). The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature*, 402 (6760), 5-11.
- (3) Pres Prescott, S. L., Macaubas, C., Holt, B. J., Smallacombe, T. B., Loh, R., Sly, P. D., & Holt, P. G. (1998). Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *The Journal of Immunology*, 160(10), 4730-4737.
- (4) Venables, K. M., & Chan-Yeung, M. (1997). Occupational asthma. *The Lancet*, 349(9063), 1465-1469.
- (5) Alcorn, J. F., Crowe, C. R., & Kolls, J. K. (2010). TH17 cells in asthma and COPD. *Annual review of physiology*, 72, 495-516.
- (6) Doe, C., Bafadhel, M., Siddiqui, S., Desai, D., Mistry, V., Rugman, P., ...& Brightling, C. E. (2010). Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD. *Chest*, 138(5), 1140-1147.
- (7) Mizutani, N., Goshima, H., Nabe, T., & Yoshino, S. (2012). Complement C3a-induced IL-17 plays a critical role in an IgE-mediated late-phase asthmatic response and airway hyperresponsiveness via neutrophilic inflammation in mice. *The Journal of Immunology*, 188(11), 5694-5705.
- (8) Hinks, T. S., Zhou, X., Staples, K. J., Dimitrov, B. D., Manta, A., Petrossian, T., ...& Djukanović, R. (2015). Innate and adaptive T cells in asthmatic patients: relationship to severity and disease mechanisms. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(2), 323-333.
- (9) Wilson, R. H., Whitehead, G. S., Nakano, H., Free, M. E., Kolls, J. K., & Cook, D. N. (2009). Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 180(8), 720-730.

- (10) Schnyder-Candrian, S., Togbe, D., Couillin, I., Mercier, I., Brombacher, F., Quesniaux, V., ... & Schnyder, B. (2006). Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *The Journal of experimental medicine*, 203(12), 2715-2725.
- (11) Fogli, L. K., Sundrud, M. S., Goel, S., Bajwa, S., Jensen, K., Derudder, E., ... & Koralov, S. B. (2013). T cell-derived IL-17 mediates epithelial changes in the airway and drives pulmonary neutrophilia. *The journal of immunology*, 191(6), 3100-3111.
- (12) Chenuet, P., Fauconnier, L., Madouri, F., Marchiol, T., Rouxel, N., Ledru, A., ... & Ryffel, B. (2017). Neutralization of either IL-17A or IL-17F is sufficient to inhibit house dust mite induced allergic asthma in mice. *Clinical Science*, 131(20), 2533-2548.
- (13) Kawaguchi, M., Onuchic, L. F., Li, X. D., Essayan, D. M., Schroeder, J., Xiao, H. Q., ... & Huang, S. K. (2001). Identification of a novel cytokine, ML-1, and its expression in subjects with asthma. *The Journal of Immunology*, 167(8), 4430-4435.
- (14) Al-Ramli, W., Préfontaine, D., Chouiali, F., Martin, J. G., Olivenstein, R., Lemiere, C., ... & Adams, R. J. (2009). Index to Volume 123. *Journal Allergy Clinical Immunology*.
- (15) Louis, R., Lau, L. C., Bron, A. O., Roldaan, A. C., Radermecker, M., & Djukanovic, R. (2000). The relationship between airways inflammation and asthma severity. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 161(1), 9-16.
- (16) Cheung, P. F., Wong, C. K., & Lam, C. W. (2008). Molecular mechanisms of cytokine and chemokine release from eosinophils activated by IL-17A, IL-17F, and IL-23: implication for Th17 lymphocytes-mediated allergic inflammation. *The Journal of Immunology*, 180(8), 5625-5635.
- (17) Wang, Y. H., Voo, K. S., Liu, B., Chen, C. Y., Uygungil, B., Spoede, W., ... & Liu, Y. J. (2010). A novel subset of CD4+ TH2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *Journal of Experimental Medicine*, 207(11), 2479-2491. (18) Fujita J, et al. *Allergy* 2012; 67(6):744-750.
- (19) Smith, D. E. (2010). IL-33: a tissue derived cytokine pathway involved in allergic inflammation and asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 40(2), 200-208.

- (20) Shi, L. Z., Wang, R., Huang, G., Vogel, P., Neale, G., Green, D. R., & Chi, H. (2011). HIF1 α -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *Journal of Experimental Medicine*, 208(7), 1367-1376.
- (21) Dang, E. V., Barbi, J., Yang, H. Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., ... & Pan, F. (2011). Control of TH17/Treg balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell*, 146(5), 772-784.
- (22) Semenza, G. L., Nejfelt, M. K., Chi, S. M., & Antonarakis, S. E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3'to the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(13), 5680-5684.
- (23) Zagórska, A., & Dulak, J. (2004). HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochimica Polonica*, 51(3):563-585.
- (24) Höpfl, G., Ogunshola, O., & Gassmann, M. (2003). Hypoxia and high altitude. *Hypoxia*, 89-115.
- (25) Hellwig-Bürgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J., & Jelkmann, W. (1999). Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α Stimulate DNA Binding of Hypoxia-Inducible Factor-1. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 94(5), 1561-1567.
- (26) Baay-Guzman, G. J., Bebenek, I. G., Zeidler, M., Hernandez-Pando, R., Vega, M. I., Garcia-Zepeda, E. A., ... & Huerta-Yepez, S. (2012). HIF-1 expression is associated with CCL2 chemokine expression in airway inflammatory cells: implications in allergic airway inflammation. *Respiratory research*, 13(1), 1-11.
- (27) Baay-Guzman, et al. Ref Type: Unpublished Work
- (28) Huerta-Yepez, S., Baay-Guzman, G. J., Garcia-Zepeda, R., Hernandez-Pando, R., Vega, M. I., Gonzalez-Bonilla, C., & Bonavida, B. (2008). 2-Methoxyestradiol (2-ME) reduces the airway inflammation and remodeling in an experimental mouse model. *Clinical immunology*, 129(2), 313-324.
- (29) Huerta-Yepez, S., Baay-Guzman, G. J., Bebenek, I. G., Hernandez-Pando, R., Vega, M. I., Chi, L., ... & Hankinson, O. (2011). Hypoxia inducible factor promotes murine allergic airway inflammation and is increased in asthma and rhinitis. *Allergy*, 66(7), 909-918.

- (30) Olson, A. H. (2006). Image analysis using the Aperio ScanScope. *Technical manual. Aperio Technologies Inc.*
- (31) Centro de Investigación en Matemáticas. México. Disponible en: <https://www.cimat.mx/es/node/797>
- (32) Degano, J. M., & Ferrer, M. L. (1993). Inmunohistoquímica. *Medicina balear*, 8(3), 119-126.
- (33) Baay-Guzman GJ, Huerta-Yeppez S, Vega MI, Aguilar-Leon D, Campillos M, Blake J, et al. Role of CXCL13 in asthma: Novel therapeutic target. *Chest* [Internet]. 2012;141(4):886–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.11-0633>