

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

Evaluación de la participación de variaciones en el número de copias del gen *TLR7* en la etiología del asma.

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS**

**P R E S E N T A
QFB. DIANA YURIDIA LÓPEZ LEY**

DIRECTORA DE TESIS

DRA. LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO

CODIRECTORA DE TESIS

DRA. SILVIA JIMÉNEZ MORALES

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE 2011

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA

Dra. Lorena Orozco Orozco

Profesora Investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Investigadora en Ciencias Médicas
Instituto Nacional de Medicina Genómica

CODIRECTORA

Dra. Silvia Jiménez Morales

Investigadora en Ciencias Médicas
Instituto Nacional de Medicina Genómica

ASESORES

Dr. Máximo Martínez Benítez

Director del Centro de Diagnóstico y Vigilancia
Epidemiológica del Distrito Federal ICyT-DF

Dra. Irma Aguilar Delfín

Investigadora en Ciencias Médicas
Instituto Nacional de Medicina Genómica

El presente proyecto de investigación fue realizado en el Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del Instituto Nacional de Medicina Genómica, bajo la dirección de las Dras. Lorena Orozco y Silvia Jiménez Morales, con la asesoría del Dr. Máximo Martínez Benítez y la Dra. Irma Aguilar Delfin.

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por su apoyo académico y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con número 330975.

AGRADECIMIENTOS

Quedo especialmente agradecida con mis directoras de tesis, la Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco y la Dra. Silvia Jiménez Morales y por haber depositado su confianza en mí, pero sobre todo por su apoyo invaluable, Gracias.

Muy agradecida estoy con mis asesores de tesis, la Dra. Irma Aguilar Delfín y el Dr. Máximo Martínez Benítez por su amabilidad y disponibilidad para conmigo y por sus sugerencias para mejorar este trabajo.

Muy agradecida estoy con todos mis profesores de la maestría, quienes fueron importantes para mi formación y me dieron las bases necesarias para desarrollar este trabajo, siempre les estaré agradecida.

Agradezco a Humberto García por compartir sus conocimientos que me ayudaron a llevar a buen término este trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio del Instituto: Lupita, Yolanda, Juan Luis, Julián, Nora y Juan José por su apoyo, sus consejos, su cariño y motivación, pero sobre todo por todos los buenos momentos que han compartido conmigo.

A mis amigos, Bere, Almita, Miguel, José Luis, Alí, Nicté, Dani y Marcos por haberse convertido en nuestra segunda familia y por darme su apoyo en cada momento, los quiero mucho.

DEDICATORIAS

A ti mamita, ya que sé que este sueño mío ha sido un gran sacrificio para tí pero aún así me apoyaste hasta el final, te amo Mamita.

A mi gran hermano y a mi pequeña hermana porque a pesar de la distancia siempre he sentido su apoyo y amor, los amo y sé que siempre cuento con ustedes.

Al amor de mi vida, Roberto, el ángel que me acompaña todos los días y vela mis sueños, los comparte y los hace realidad, te amaré siempre.

A mi maravillosa familia por su inmenso amor y apoyo incondicional en mi vida, siempre los llevo en mi corazón.

A ti Dios, por hacer realidad este sueño y por haberme permitido conocer en esta etapa de mi vida a personas maravillosas, pero sobre todo por tu infinito amor.

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
RESÚMEN.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTECEDENTES GENERALES.....	1
1.1 Definición.....	3
1.2 Diagnóstico.....	4
1.3 Fisiopatología.....	7
1.4 Etiopatogenia del asma.....	12
1.4.1 Factores intrínsecos.....	12
1.4.2 Factores ambientales.....	14
1.4.3 Factores genéticos.....	17
2. ANTECEDENTES PARTICULARES.....	23
2.1 Familia de receptores Toll	23
2.1.1 Receptores tipo Toll y asma	28
2.2 Receptores tipo Toll 7.....	31
2.2.1 Papel del gen <i>TLR7</i> en la etiopatogenia del asma.....	33
II. JUSTIFICACIÓN.....	36
III. HIPÓTESIS.....	37
IV.OBJETIVOS.....	37
1. Objetivo general.....	37
2. Objetivos específicos.....	37
V. Estrategia general.....	38

VI. METODOLOGÍA.....	39
1. Tipo de estudio.....	39
2. Población de estudio.....	39
2.1 Criterios de inclusión y de exclusión.....	39
3. Muestras biológicas y extracción de ADN genómico.....	40
3.1 Cuantificación y evaluación de la integridad del ADN.....	41
4. Análisis molecular.....	42
4.1 Determinación de CNVs.....	42
4.2 Validación de CNVs.....	45
4.3 Análisis estadístico.....	45
VII. RESULTADOS.....	47
1. Población analizada.....	47
2. Estudio molecular.....	47
2.1 Evaluación de la integridad del ADN.....	47
2.2 Evaluación de eficiencias de reacción.....	49
2.3 Validación de CNVs.....	51
2.4 Análisis de genotipificación.....	54
VIII. DISCUSIÓN.....	58
IX. CONCLUSIONES.....	63
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
XI. ANEXO.....	75
1. Carta de consentimiento informado.....	75
2. Hoja de captación de datos.....	76
XII. APÉNDICE.....	81

ABREVIATURAS

HRB	Hiperrespuesta bronquial
VA	Vías Aéreas
PEF	Flujo espiratorio máximo
FEF	Flujo alcanzado de la capacidad vital
FEV1	Volúmen espiratorio forzado al primer segundo
VA	Vía aérea
IgE	Inmunoglobulina específica de clase E
CPAs	Células presentadoras de antígeno
IL	Interleucina
Th	Linfocito T colaborador
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
IFN- γ	Interferón gamma
ICAM 1	Molécula 1 de adhesión celular
VCAM 1	Proteína 1 de adhesión vascular
Th0	Linfocito T no activado
LB	Linfocito B
FcERI	Receptor de IgE de alta afinidad
Tregs	Linfocitos T reguladores
RV	Rinovirus VSR Virus sincicial respiratorio
PIV	Virus parainfluenza
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido

TLRs	Receptores tipo Toll
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
CDps	Células dentríticas plasmacitoides
CARD4	Dominio 4 de reclutamiento de caspasa
CARD15	Dominio 15 de reclutamiento de caspasa
GSTM1	Glutación S-transferasa 1
GSTP1	Glutación S-transferasa P 1
GSTT1	Glutación S-transferasa θ 1
ADRB2	Receptor 2 beta adrenérgico
CFTR	Regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística
SPINK5	Inhibidor de serín peptidasa tipo kazal 5
FLG	Filagrina
DEF1	Defensina alfa 1
IL4RA	Receptor alfa de interleucina 4
IFNGR1	Receptor 1 de interferón gamma
STAT6	Transductor de señal y activador de transcripción 6
GATA3	Proteína 3 de unión a GATA
TBX21	Proteína 21 de caja TATA
CNVs	Variaciones en el número de copias
NF- κ B	Factor nuclear κ B
MyD88	Proteína 88 primaria de diferenciación mieloide
IRF7	Factor 7 de respuesta a interferón

IRAK4	Cinasa 4 asociada al receptor de IL-1
TRAF6	Factor 6 asociado al receptor de TNF
TRAF3	Factor 3 asociado al receptor de TNF
IRAK1	Cinasa 1 asociada al receptor de IL-1
IKK α	Inhibidor de cinasa NF- κ B
RE	Retículo endoplásmico
TBP	Proteína de unión a caja TATA
NEMO	Modulador esencial de NF- κ B

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mapa de la prevalencia mundial de asma clínico.	2
Figura 2. Fisiopatología del asma.	9
Figura 3. Mapa cromosómico de ligamiento para asma.	19
Figura 4. Ligandos PAMPs reconocidos por los TLRs.	24
Figura 5. Vía de señalización TLR.	26
Figura 6. Vía de señalización mediada por TLR7.	32
Figura 7. Diseño y localización de los primers específicos para el gen <i>TLR7</i> para el análisis de CNVs.	43
Figura 8. Análisis de la integridad del ADN.	48
Figura 9. Gráfica de eficiencias de amplificación	50
Figura 10. Determinación del número de copias de <i>TLR7</i> mediante PCR semicuantitativa.	51
Figura 11. Gráfica de picos densitométricos.	52
Figura 12. Estimación del NC mediante densitometría	53
Figura 13. Frecuencias de los CNVs del gen <i>TLR7</i> en la población mexicana.	55
Figura 14. Distribución relativa del número de copias del gen <i>TLR7</i> en casos y controles.	56

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Criterios GINA para establecer el diagnóstico de asma.	5
Tabla 2. Factores ambientales relacionados con la etiopatogenia del asma.	14
Tabla 3. Estudios de asociación de SNPs en los genes <i>TLRs</i> .	30
Tabla 4. Condiciones de amplificación durante la PCR en tiempo real.	44
Tabla 5. Análisis de riesgo relativo	57

RESÚMEN

El receptor TLR7 ha sido fuertemente involucrado en la etiología del asma, múltiples estudios han reportado que en pacientes asmáticos la actividad de este receptor se encuentra reducida y también se ha documentado que la estimulación de éste receptor, disminuye los síntomas de asma alérgica., Por otro lado varios estudios, sugieren que en este mecanismo parecen estar involucradas polimorfismos genéticos; como variaciones en el número de copias presentes en este gen.

OBJETIVO: Determinar si variaciones en el número de copias (CNVs) del gen *TLR7* participan en la etiología del asma. **METODOLOGÍA:** Se realizó un estudio de asociación de casos y controles en el cual se incluyeron niños con diagnóstico clínico de asma y como grupo control, adultos sin antecedentes de asma o alergia. Los pacientes fueron reclutados de 4 Instituciones hospitalarias de tercer nivel de la Ciudad de México y los controles fueron obtenidos del banco de DNA genómico del Instituto Nacional de Medicina Genómica. Tanto los casos como los controles fueron mestizos-mexicanos. La determinación de las CNVs se realizó mediante PCR en tiempo real usando el método $\Delta\Delta Ct$. Para comparar la distribución relativa del número de copias entre casos y controles, se empleó la prueba no paramétrica de U Mann-Whitney. Los riesgos relativos (ORs) se estimaron con un 95% de intervalo de confianza (IC) usando un modelo de regresión logística. **RESULTADOS:** En el estudio se incluyeron 314 pacientes con diagnóstico clínico y funcional de asma de 5 a 16 años con promedio de edad de 10.8 años \pm 2.9 y 314 individuos sanos. Ciento ochenta pacientes y 180 controles fueron del género masculino (57.3%), mientras

que ciento treinta y cuatro (43.7%) fueron mujeres. En la población analizada 186 (59.2%) pacientes y 181 (57.6%) controles tenían sólo una copia de este gen, mientras que 127 (40.4%) pacientes y 132 (42%) controles eran portadores de dos copias, interesantemente del total de la muestra analizada solo un individuo fue portador de tres copias del gen 1 (0.3%). El análisis comparativo en la distribución de las CNVs, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles ($p= 0.8265$), sin embargo, al estratificar por género femenino se observó mayor frecuencia en casos con respecto a los controles de mujeres portadoras de una copia (5.22% vs 0.74%, respectivamente) aunque el valor de p únicamente mostró tendencia a la significancia ($p=0.064$) con un OR = 7.33 (IC 95% 0.890-60.45). **CONCLUSIONES:** Los resultados sugieren que un bajo número de copias del gen TLR7 en el género femenino pero no así en el masculino podría ser un factor de riesgo para desarrollar asma y se requiere del análisis de una población mayor para confirmar estos hallazgos.

I. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES GENERALES

El asma es una enfermedad crónica del sistema respiratorio, cuya alta prevalencia a nivel mundial, elevadas cifras de morbilidad y mortalidad e importantes costos de atención la convierten en un problema global de salud (Masoli y cols., 2004). En México, mediante un estudio realizado en 2007, se estimó un costo directo anual por atención a nivel nacional de entre 32 a 35 millones de dólares (Gallardo Martínez y cols., 2007).

La prevalencia del asma ha aumentado rápidamente durante las últimas décadas hasta alcanzar proporciones epidémicas, actualmente se estima 300 millones de enfermos en todo el mundo y se prevee un incremento dramático en el número de casos en los próximos 20 años (Murdoch y cols., 2010).

La prevalencia del asma es variable entre las distintas poblaciones, reportándose frecuencias desde el 1.4 a 4.2% en países como Albania, Austria, Bélgica, Estonia, Alemania, India, Georgia, Latvia, Polonia e Irán hasta un 27.1% en los países de Australia, Costa Rica y Nueva Zelanda (Fig. 1) (ISAAC, 1998).

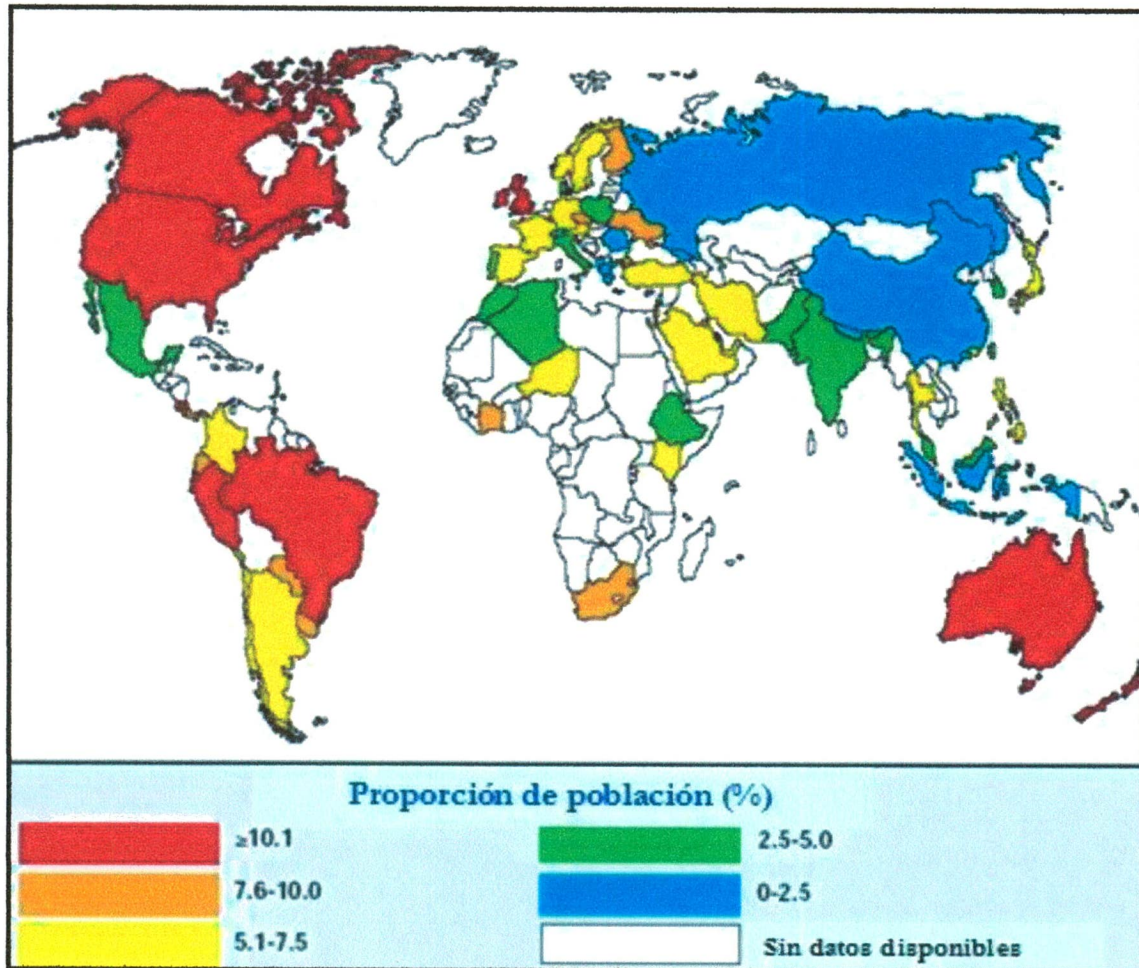


Figura 1. Mapa de la prevalencia mundial de asma clínico. Variación mundial de la prevalencia de síntomas asmáticos, datos publicados del estudio ISAAC.

En México, de acuerdo a Vargas Becerra (2009), esta entidad tiene una incidencia de 2.78 por 1,000 habitantes y afecta entre el 5 y 10% de la población general, siendo mayor en los niños. Según el Instituto Nacional de Pediatría de México, el asma se presenta en el 15% de la población infantil mexicana, de hecho, diferentes reportes indican que el asma está dentro de las primeras tres causas de atención en urgencias pediátricas (Lara Pérez, 2001).

1.1 Definición

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, caracterizada principalmente por una hiperrespuesta bronquial (HRB), secreción excesiva de moco y remodelación de las vías aéreas, procesos que conducen a una limitación del flujo de aire en las vías aéreas de los pacientes (GINA, 2008).

1.2 Diagnóstico

El diagnóstico de asma resulta de la combinación de tres elementos: una historia clínica concordante (antecedentes familiares y personales), la exploración física y la evaluación de la función pulmonar (espirometría) (Bercedo Sanz y cols., 2007).

En la historia clínica, la presencia de episodios recurrentes de broncoespasmos, sibilancias, dificultad para respirar y opresión torácica, son indicativas de la presencia de la enfermedad (GINA, 2008). Sin embargo el estándar de oro es la prueba de función pulmonar evaluada mediante espirometría, la reversibilidad de la obstrucción de las vías aéreas (VA) en un 12% después del tratamiento con broncodilatadores confirma el diagnóstico de la enfermedad (Ortega Martell y Fernández vega, 2009).

Las diferentes pruebas de función respiratoria: Flujo espiratorio máximo (PEF), Flujo alcanzado de la capacidad vital (FEF) y volumen espiratorio forzado al primer segundo (FEV1), permiten evaluar la gravedad del asma y la respuesta al tratamiento (Ortega Martell y Fernández vega, 2009). Sin embargo, el diagnóstico en lactantes y preescolares es fundamentalmente clínico, dado que en menores de 5 años no es posible la realización de pruebas de función pulmonar (Tabla 1) (GINA, 2008).

Tabla 1. Criterios GINA para establecer el diagnóstico y la gravedad del asma.

Clasificación	Síntomas diurnos	Síntomas nocturnos	FEV1	Tratamiento
Intermitente	<1 vez por semana	≤ 2 veces al mes	> 80%	no necesario ó corticoesteroides y β_2 agonistas a demanda.
	No interfiere con las actividades cotidianas.			
Persistente Leve	>1 vez a la semana pero < 1 vez al día	> 2 veces al mes	≥ 80%	Dosis bajas de corticoesteroides inhalados y mantenimiento teofilina o modificadores de leucotrienos.
	En ocasiones interfiere con las actividades normales.			
Persistente Moderada	Diarios	>1 vez a la semana	60-80%	Dosis medias de corticoesteroides inhalados, más dosis medianas de β_2 agonistas de acción prolongada o leucotrienos.
	Interfiere seriamente con las actividades normales			
Persistente Severa	Continuos	Frecuentes	< 60%	Altas dosis de corticoesteroides combinados con sustancias relacionadas a teofilina, β_2 agonistas de acción prolongada o modificadora de leucotrienos.
	Actividad física limitada y exacerbaciones que ponen en peligro la vida			

FEV1 (Volúmen espiratorio forzado al primer segundo)

Por otra parte, el asma puede o no estar asociada a atopia o alergia, de hecho, de los casos pediátricos cerca de un 60% desarrollan asma alérgica. La atopia se define como la presencia de niveles elevados de IgE total o específica en suero de pacientes asmáticos, además se caracteriza por una respuesta exagerada tipo Th2 (Moncayo y cols., 2010; Pearce y cols., 1999; Fan, 2006).

La IgE total es un marcador muy poco específico y poco sensible, puesto que muchas enfermedades pueden cursar con IgE elevada: parasitosis, virosis, enfermedades autoinmunes etc (Bercedo Sanz y cols., 2007). La identificación de IgE específica permite reconocer la sensibilización frente a un alérgeno determinado, lo que unido a la historia clínica sugestiva orienta al diagnóstico de asma alérgica (Bercedo Sanz y cols., 2007).

Estos datos son necesarios, principalmente para diseñar las medidas terapéuticas adecuadas como el evitar la exposición a los factores desencadenantes de las exacerbaciones de los síntomas. Si el paciente no mejora evitando la exposición al alérgeno, estas pruebas le ayudarán al médico especialista en alergia para considerar otras acciones como el uso de inmunoterapia (Ortega Martell y Fernández vega, 2009).

A diferencia del asma atópica que suele iniciar en la niñez, el asma no atópica comienza en la vida adulta, en muchos casos se asocia con irritantes químicos, sinusitis maxilar, drogas, ejercicio, infecciones, frío y estrés, usualmente no hay una historia familiar ni evidencia de hiperrespuesta mediada por IgE, además presenta un

curso crónico, con pronóstico desfavorable y requiere de esteroides orales para su control (Pereira y cols., 2007; Jiménez-Morales, 2009; Kraneveld y cols., 2002; Weinmayr y cols; 2007).

1.3 Fisiopatología

En los últimos años, numerosos estudios han demostrado el papel central de la inflamación, como determinante de la obstrucción del flujo aéreo en el asma. La inflamación de las VA, encontrada virtualmente en todos los individuos afectados, es ahora vista como el factor más directamente relacionado con la gravedad de la enfermedad (Stone Aguilar y cols., 2005).

En el asma alérgica, los alérgenos inhalados inducen la activación de las células presentadoras de antígeno (CPAs). En la respuesta alérgica temprana, a pocos minutos de contacto con el alérgeno, los mastocitos sensibilizados liberan histamina, leucotrienos y citocinas, tanto preformados como sintetizados recientemente, los cuales promueven el aumento de la permeabilidad vascular, la contracción del músculo liso y la producción de moco. Las quimiocinas liberadas por los mastocitos y otros tipos celulares, dirigen el reclutamiento de células inflamatorias que contribuyen a la respuesta alérgica tardía, caracterizada por afluencia de eosinófilos y células Th2. Los eosinófilos además de liberar una gran cantidad de histamina y leucotrienos, también secretan proteínas básicas e interleucinas (IL) -3, -5 y -13, de

esta forma estos mecanismos permiten perpetuar la respuesta alérgica inflamatoria Th2 (Holgate y Polosa, 2008).

Aunque la inflamación mediada por citocinas Th2 es fundamental en la patogénesis del asma, ésta no es suficiente para que la enfermedad se manifieste. En las VA remodeladas, las citocinas, los mediadores celulares y las moléculas de la matriz generan un microambiente óptimo para mantener la respuesta inflamatoria crónica y en la forma más grave de la enfermedad se crea un ambiente para el desarrollo de un perfil de citocinas Th1 (Jiménez-Morales, 2009).

El perfil Th1 involucra la participación de neutrófilos y linfocitos Th1, así como también de citocinas pleiotrópicas tales como IL-1, TNF α (factor de necrosis tumoral alfa) e IFN- γ (interferón gama). Estas citocinas, inducen la activación de las células endoteliales, aumentando la expresión de moléculas de adhesión como ICAM1 (molécula de adhesión intercelular 1) y VCAM1 (molécula de adhesión celular vascular 1) que favorece la salida de leucocitos del espacio intravascular a la mucosa de las vías aéreas y potencia el proceso inflamatorio (Jiménez-Morales, 2009; Holgate y Polosa, 2008). Más aún, la IL-4 derivada de células Th2, aumentan la expresión de VCAM1 y por lo tanto el proceso inflamatorio (Figura 2) (Holgate y Polosa, 2008).

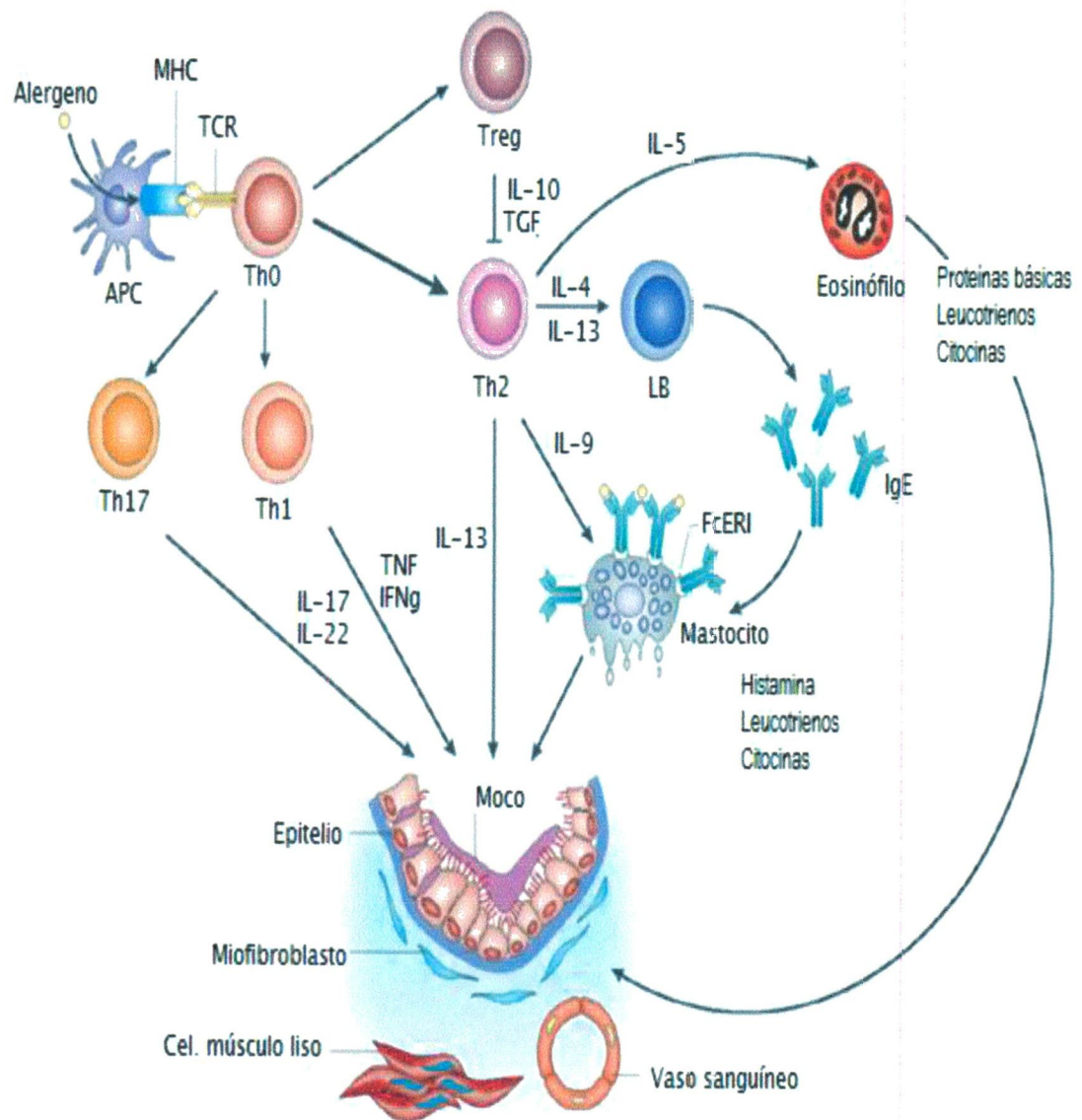


Figura 2. Fisiopatología del asma. El asma se produce a partir de una desregulación del sistema inmunológico, en el cual intervienen varios tipos de células y elementos celulares principalmente tipo Th2. CPA: célula presentadora de antígeno; IFN γ : interferón gamma; IL: interleucina; Th: linfocito T colaborador; Th0: linfocito T no activado; LB: Linfocito B; Treg: Linfocito T regulador; IgE: Inmunoglobulina E; FcERI: Receptor de IgE de alta afinidad. Tomado de Holgate y Polosa, (2009).

En los últimos años han surgido otros subconjuntos de células T CD4⁺ con importantes implicaciones en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria: las células T reguladoras (Tregs) y las Th17 efectoras. Las células Treg suprimen potencialmente la respuesta inmune, actuando como antiinflamatorios. Las principales subclases de Treg son CD25 (hi), Foxp3 (+) y Treg productoras de IL-10, las cuales se encuentran disminuidas en número o función en los pacientes asmáticos (Martínez Aguilar, 2009). Las células Th17, con función proinflamatoria, secretan IL-17A e IL-17F y parecen estar específicamente relacionadas con los eventos de inflamación neutrofílica que se producen durante las exacerbaciones de la enfermedad y en la remodelación tisular (Holgate y Polosa, 2008). El efecto de la IL-17 sobre el epitelio respiratorio, es la producción de quimiocinas que favorecen un infiltrado de neutrófilos a las VA y cuya actividad enzimática correlaciona con el grado de hiperreactividad bronquial en los pacientes asmáticos (Martínez Aguilar, 2009).

Por lo tanto, está claro que una pérdida en la homeostasis de la respuesta inmune conduce al desarrollo de entidades alérgicas o autoinmunes. La programación del sistema inmune se inicia tempranamente en la vida del individuo, la ausencia relativa de una exposición a alérgenos o un contacto microbiano, particularmente al inicio de la vida, puede facilitar el desarrollo de las enfermedades alérgicas (Beisswenger y Bals, 2008). De hecho, se ha planteado que el incremento en las últimas décadas de la prevalencia de entidades alérgicas, es parcialmente atribuible a una reducida exposición a patógenos ambientales en edades tempranas, al uso elevado de antibióticos y a las mejoras en los servicios de salud (Beisswenger

y Bals, 2008; Boyce y cols., 2008).

Estos eventos, pueden resultar en una disminución de la estimulación de las células de la respuesta inmune innata (Th1) y en la reducción de la producción de IL-12, la citocina polarizante de respuesta Th1 más importante, por lo tanto en estas condiciones, la respuesta inmune se desplaza hacia una excesiva respuesta de tipo Th2 o alérgica (Kaisho y Akira, 2006; Romagnani, 2004).

Algunas evidencias que apoyan estas aseveraciones, son los estudios en poblaciones de niños que crecen en ambientes pobres o en granjas, donde las prevalencias de entidades alérgicas son más bajas comparadas con las prevalencias observadas en países occidentalizados (Vercelli, 2008).

1.4 Etiopatogenia del asma

El asma es una enfermedad multifactorial, causada por la interacción de múltiples variantes genéticas y diversos factores ambientales en una dinámica compleja que determina el tipo, gravedad, pronóstico y respuesta al tratamiento de esta patología (Zhang y cols., 2008). Se ha propuesto, que como en todas las entidades multifactoriales, en el desarrollo del asma, la interacción de los factores genéticos y ambientales es inversamente proporcional. Es decir, individuos con una alta susceptibilidad genética requieren de pocos factores ambientales para que la enfermedad se manifieste, mientras que en casos con baja susceptibilidad se necesitan de más inductores ambientales para padecerla (Jiménez-Morales, 2009).

1.4.1 Factores Intrínsecos

El género, la edad y el origen de la población pueden contribuir al riesgo de padecer asma. Antes de la pubertad, su incidencia es más alta en niños que en niñas y después de esta etapa el patrón se invierte y la prevalencia de la enfermedad en la adultez puede ser de hasta 50% más alto en mujeres que en hombres, lo que sugiere que las hormonas sexuales desempeñan un papel muy importante en el desarrollo y progresión del asma (Vrieze y cols., 2003; Jeon y cols., 2009). Se ha documentado de estudios realizados en ratones, que las hormonas femeninas regulan negativamente la producción de células T reguladoras (Treg), las cuales a su vez

participan en la regulación de la respuesta tipo Th2 (Melgert y cols., 2005; Tam y cols., 2011). Se ha observado que hormonas como el estradiol inducen la expresión tanto de citocinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α) como de citocinas antiinflamatorias (IL-10). La progesterona aumenta la expresión de IL-10, IL-1 β y TNF- α en pulmones. La existencia de este efecto biológico del estradiol y la progesterona puede ser crítico en la respuesta del hospedero ante los alérgenos ambientales (Haggerty y cols., 2003; De Oliveira y cols., 2007).

Por otra parte, también se sabe que la susceptibilidad al asma puede variar en función de los grupos raciales, en este contexto la población afroamericana tiene una de las tasas de incidencia más altas (105.5 por cada 1000) que se han reportado, de hecho ésta alcanza 35% más que la población caucásica (78.2 por cada 1000) (American Lung Association, 2008; Shalowitz y cols., 2007).

Estas diferencias interraciales también se ven reflejadas en la tasa de mortalidad, ya que en la población afroamericana ésta es mayor (2.9 por cada 100,000) que la de la población caucásica (0.9 por cada 100,000) (Centers for Disease Control and Prevention, 2009; Haselkorn y cols., 2008).

1.4.2 Factores ambientales

Existen diversos factores ambientales que de un modo u otro se han relacionado con la etiopatogenia del asma, en ocasiones suponiendo su participación en el desarrollo de la enfermedad o como factores precipitantes de las crisis asmáticas. Dentro de ellos se incluyen alérgenos ambientales como pelos de animales, ácaros, cucarachas, hongos, polen, alérgenos ocupacionales o irritantes (Tabla 2). Otros inductores de las exacerbaciones del asma lo constituyen agentes químicos como el humo del tabaco, la contaminación, los medicamentos, el estrés y las infecciones virales, estas últimas constituyen la principal causa de exacerbación del asma (Martínez Aguilar, 2009; Ait-Khaled y cols., 2008).

Tabla 2. Factores ambientales relacionados con la etiopatogenia del asma.

<i>Alérgenos ambientales</i>	<i>Agentes químicos</i>	<i>Otros factores</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Alérgenos animales • Ácaros • Cucarachas • Hongos • Pólenes 	<ul style="list-style-type: none"> • Humo de tabaco • Contaminación 	<ul style="list-style-type: none"> • Ejercicio • Rinitis/sinusitis • Infecciones víricas • Sensibilidad a aspirina y otros AINES

AINES: antiinflamatorios no esteroideos

Dentro de los principales virus asociados a asma se encuentran el virus de la influenza, rinovirus (RV) y el virus sincicial respiratorio (VSR). Las sibilancias asociadas con infecciones de RV, son el factor de riesgo predictor más importantes en el desarrollo de asma en individuos con antecedentes familiares de asma o atopia (Jackson y cols., 2008).

Para contener las posibles amenazas del medio ambiente, los pulmones cuentan con complejos mecanismos de defensa, tanto físicos como inmunológicos. La anatomía de las fosas nasales y el patrón de ramificación de las vías respiratorias impiden la penetración de partículas infecciosas relativamente grandes y pesadas, mientras que las estrechas uniones intercelulares garantizan la integridad estructural del epitelio pulmonar, además existe una barrera de células caliciformes que segregan moco y células epiteliales ciliadas que ayudan a expulsar las partículas atrapadas en una placa viscosa de mucosidad (Lafferty y cols., 2010).

Las células epiteliales además de tener un papel estructural, también participan en la respuesta inmune ya que pueden reconocer microorganismo a través de receptores. Estos receptores son conocidos como receptores de reconocimiento de patógenos (PRR, por sus siglas en inglés) y están clasificados en 3 familias: receptores tipo RIG-I (RLRs), receptores tipo NOD (NLRs) y los receptores tipo toll (TLRs) (Kawai y Akira, 2010).

La familia RLR se compone de tres miembros: RIG, Mda5 y LGP2, que se encuentran localizados en el citoplasma, reconocen ARN viral e inducen la respuesta del huésped a través del adaptador IPS-1. La familia de NLR está compuesta por más de 20 miembros y reconocen partículas PAMP y no PAMP, además también responden ante estrés celular. La proteína citoplasmática NALP3, miembro de esta familia, desencadena la activación de la caspasa inflamatoria tipo 1 y la producción de IL-1 β madura, recientemente esta proteína ha sido implicada en el desarrollo de fibrosis pulmonar inducida por asbesto. Aunque ambos tipos de receptores podrían estar jugando un papel en la inducción de la inflamación pulmonar su rol aún no ha sido bien establecido (Lafferty y cols., 2010).

Los TLRs, tienen un papel fundamental en la respuesta inmune innata y adaptativa, su participación en la inflamación pulmonar ha sido documentada, sin embargo los mecanismos moleculares aún no se entienden por completo (Kawai y Akira, 2010).

1.4.3 Factores genéticos

Hasta la fecha se tiene bien establecido, que el asma es de índole hereditario, varios estudios familiares han aportado evidencia de un patrón de agregación familiar importante en esta enfermedad. Sin embargo, la genética del asma es compleja por su naturaleza poligénica y patrón de herencia no definido (Pinto y cols., 2008).

Los principales estudios que proponen al asma como una enfermedad genética son los realizados en familias y en gemelos. Estos estudios han revelado que en aquellas familias donde hay un caso de asma, el riesgo de los familiares de primer grado a padecer la enfermedad es de hasta cinco veces más que la población general y que la concordancia en gemelos monocigotos es casi seis veces mayor que la observada en gemelos dicigotos (70% vs 12% respectivamente). Así, la fracción atribuible a factores genéticos que explican la enfermedad (heredabilidad) se estima de 36 – 79% (Manian, 1997).

La identificación de estos factores genéticos involucrados en la etiopatogenia del asma se ha logrado principalmente mediante dos abordajes, estudios de ligamiento y estudios de asociación (Ober y Hoffjan, 2006).

Los estudios de ligamiento evalúan la cosegregación de un marcador con la enfermedad, mientras que los estudios de caso-control determinan la coocurrencia de un marcador con la patología. Los estudios de ligamiento presentan muchas limitaciones en el análisis genético de las entidades complejas, la principal es que

requieren de estructuras familiares muy grandes y sólo permite identificar a genes que tienen un efecto importante en la etiología de la enfermedad. Por su parte, los estudios de caso control son muy útiles en la identificación de los factores genéticos asociados a una enfermedad compleja, ya que tienen la ventaja de ser menos costosos, es más fácil la obtención de muestras de individuos no relacionados y además permiten detectar genes con un efecto pequeño en la enfermedad (Vercelli, 2008; Ober y Hoffjan, 2006). Con los estudios de ligamiento se ha determinado que en casi todos los cromosomas hay loci de susceptibilidad a asma, atopia y sus fenotipos relacionados, como niveles elevados de IgE, sibilancias e hiperreactividad bronquial (Figura 3), sin embargo, el cromosoma 5 es donde se han identificado el mayor número de genes ligados a asma y los que más consistentemente han sido replicados en varias poblaciones (Schwartz, 2009).

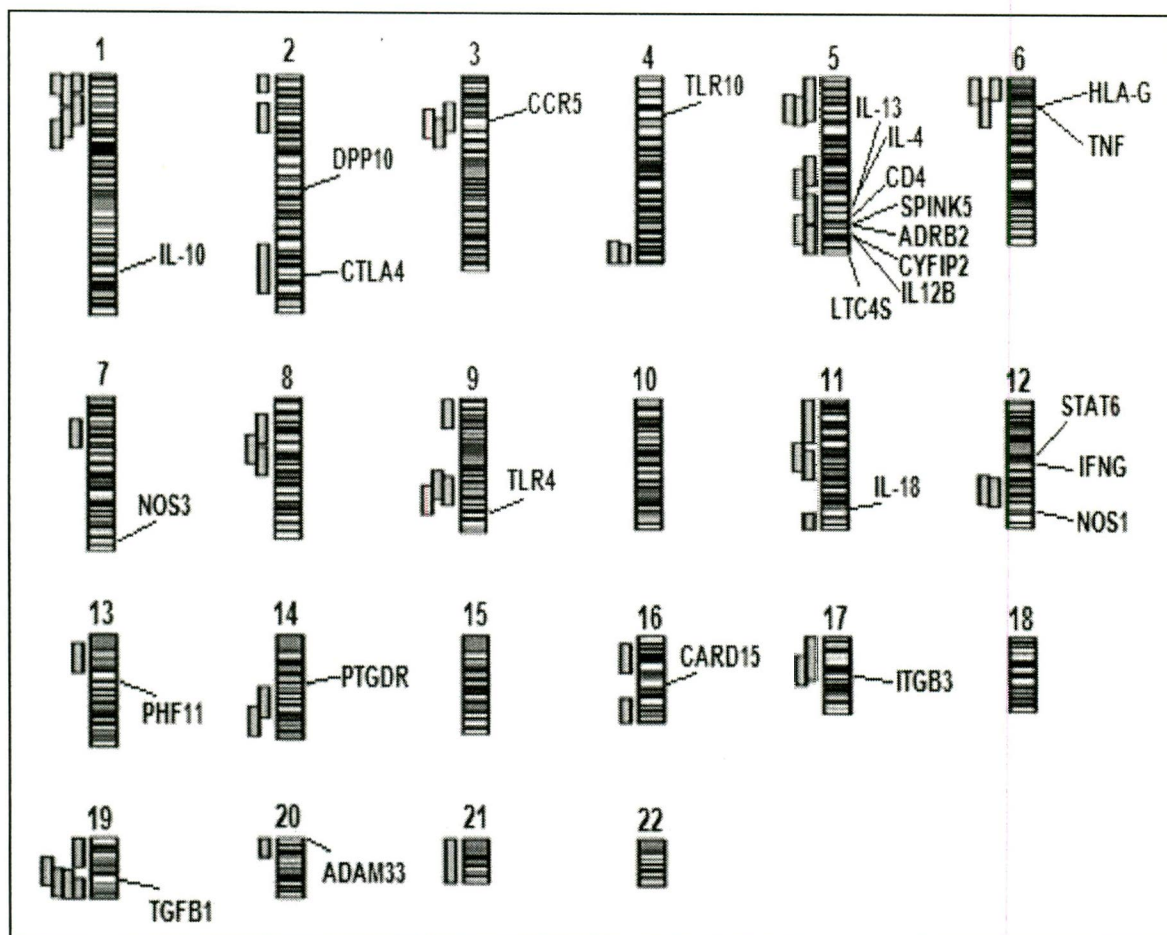


Figura 3. Mapa cromosómico de ligamiento para asma. Los loci de rasgos cuantitativos se muestran como barras a la derecha de sus respectivos cromosomas. Los genes específicos asociados a asma se encuentran localizados a la derecha de cada cromosoma. Tomado de Schwartz (2009).

Los estudios de asociación, se han basado principalmente en el análisis de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) y han permitido la identificación de más de 200 genes candidato para asma, sin embargo, muchos de ellos no han sido replicados sistemáticamente en varias poblaciones, sugiriendo la posibilidad de que existen variantes de riesgo propias de cada población (Wu y cols., 2010).

Mediante los estudios de ligamiento de genoma completo, genes candidatos y estudios de asociación de genoma completo realizados en asma y fenotipos asociados se ha logrado determinar un amplio número de genes implicados en la susceptibilidad y la patogénesis de esta enfermedad (March y cols., 2011). Estos genes pueden ubicarse en diferentes grupos: i) genes que codifican para moléculas de la barrera epitelial: como el gen de la filagrina (FLG) el cual se ha asociado fuertemente con dermatitis atópica, eczema, y asma (Marenholz y cols., 2006; Morar y cols., 2007; Palmer y cols., 2007); el gen de la defensina-beta1 (*DEF1*), las quimiocinas CCL-5, -11, -24, y -26 involucradas en reclutamiento celular, así como variaciones en el gen SPINK5 también se han asociado a asma (Zhang y cols., 2003; Genuneit y cols., 2009; Kabesch y cols., 2004; Liu y cols., 2009); ii) genes que participan en la diferenciación Th1-Th2: GATA3, TBX21, IL4, IL4RA, STAT6 e IL12B han sido implicados en asma y alergia.(Genuneit y cols., 2009; Haller y cols., 2009; Howard y cols., 2002; Kabesch y cols., 2006; Pykäläinen y cols., 2005; Randolph y cols., 2004; Suttner y cols., 2009). iii) genes involucrados en la inflamación alérgica y estrés oxidante a nivel de tejido: el gen de la desintegrina y metaloproteasa ADAM33, la cadena alpha-1 de colágeno tipo 29 (COL29A1), leucotrieno C4 sintasa (LTC4S),

glutación S-transferasa (GSTP1,GSTM1), araquidonato 5-lipoxigenasa (*ALOX-5*); y sintetasa de óxido nítrico 1 (*NOS1*), además del gen del receptor beta-2 adrenérgico (*ADRB2*) implicado en la modulación de la respuesta a broncodilatadores inhalados (Hawkins y cols., 2008). iv) genes de receptores y moléculas implicadas en el reconocimiento de patógenos y alérgenos: dentro de éstos se incluyen los receptores de reconocimiento de patrones y receptores extracelulares como *CD14*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR6* y *TLR10*; receptores intracelulares como *NOD1/CARD4*, *TLR3*, *TLR7*, *TLR9* (Eder y cols., 2006; Eder y cols., 2004; Kabesch y cols., 2004; Kormann y cols., 2008; Smit y cols., 2009) y también se han reportado variaciones en los genes *HLA* clase II asociadas con asma y con respuesta IgE específica de alérgeno. (Li y cols., 2010).

Recientemente, genes involucrados en el reconocimiento a patógenos han sido un punto de atención en la investigación de asma y enfermedades alérgicas, debido a sus posibles implicaciones terapéuticas, de hecho diversos autores han sugerido un importante rol de los receptores tipo Toll (TLRs) en la fisiología de esta enfermedad, lo que ha conducido a proponerlos como potenciales blancos para la intervención farmacológica en la prevención y tratamiento de las enfermedades atópicas (Herrera y cols., 2010).

Aunque en las últimas décadas la mayoría de las investigaciones de variantes genéticas asociadas a enfermedades complejas se han centrado en el estudio de SNPs, los resultados obtenidos mediante estos, no ha sido del todo reproducibles, esto en parte, es explicado por la heterogeneidad genética entre las poblaciones y

por la interacción entre el genotipo y los factores ambientales. Sin embargo, en los últimos años se ha identificado una nueva fuente de variación genética asociada a la etiología de las entidades complejas; las variaciones en el número de copias (CNVs), éstas se definen como cambios estructurales en el ADN que consisten en deleciones o duplicaciones de segmentos de DNA de más de 1Kb (Pankratz y cols., 2011), y dado que representan una fuente importante de la variabilidad genética total en humanos su aplicabilidad en los estudios de asociación ha ido en aumento (Redon y cols., 2006; Beckmann y cols., 2007). De hecho, investigaciones recientes han relacionado a las CNVs con enfermedades complejas como alzheimer, autismo, enfermedad de Crohn, susceptibilidad a VIH, parkinson, psoriasis, artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico (Zhang y cols., 2009). Sin embargo la participación de las CNVs en la etiología del asma han sido muy poco estudiadas, a la fecha únicamente se han evaluado en los genes GSTM1 y GSTT1, moléculas involucradas en la interacción del individuo con su medio ambiente, en los cuales, se observó que una disminución en el número de copias, se asocian con la susceptibilidad a padecer la enfermedad (Brash-Andersen y cols., 2004), hallazgos como éste, sugieren que estos polimorfismos pueden contribuir de manera importante a la fisiopatología del asma.

2. ANTECEDENTES PARTICULARES

2.1 Familia de receptores Toll like

La familia de los TLRs es un importante grupo de receptores a través de los cuales la respuesta inmune innata reconoce microorganismos invasores, por lo que son moléculas claves para la eliminación de patógenos así como para el reclutamiento de fagocitos a los sitios de infección (Parkers y cols., 2007). Los TLRs son proteínas transmembranales que contienen repetidos ricos en leucinas (LRRs) encargados de sensar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) y dominios homólogos a los receptores Toll/interleucina 1 ((TIR) que señalizan a través de adaptadores río abajo en la vía de señalización de los TLRs (Takeuchi y Akira, 2007; McCartney y Colonna, 2009).

En el ratón se han identificado 13 miembros y en humano se conocen hasta ahora 11 miembros de esta familia (TLR1 – TLR11) los cuales detectan un amplio rango de microorganismos, bacterias, hongos, protozoarios y virus (Parkers y cols., 2007; Goldman, 2007; Sabroe y cols., 2003).

Los TLR están divididos en dos subgrupos de acuerdo a su localización celular y al reconocimiento de PAMPs. Un grupo está compuesto por los TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11, que se expresan en la superficie celular y reconocen componentes de las membranas microbianas como proteínas, lípidos y lipoproteínas.

El otro grupo lo forman los TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, los cuales se expresan exclusivamente en vesículas intracelulares, endosomas, lisosomas y endolisosomas, y participan en el reconocimiento de ácidos nucleicos bacterianos, virales y del hospedero (Figura 4) (Mogensen, 2009; Kawai y Akira, 2010). TLR3 reconoce RNA de doble cadena, el cual constituye el genoma de virus de RNA de doble cadena y es también un intermediario durante la replicación de virus de cadena sencilla (Alexopoulou y cols., 2001). TLR7 y TLR8 reconocen RNA de cadena sencilla así como también componentes de imidazolequinilona la cual es conocida por sus propiedades antivirales (Diebold y cols., 2004; Heil y cols., 2004). Por su parte, TLR9 reconoce DNA no metilado (CpG), lo cual es común encontrar en los genomas de virus de DNA (Beutler y cols., 2006).

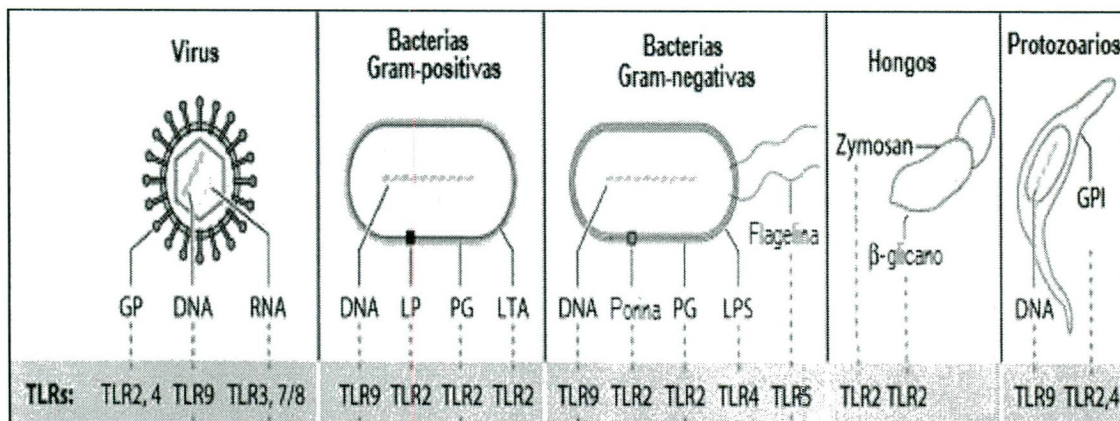


Figura 4. Ligandos PAMPs reconocidos por los TLRs. Los TLRs reconocen diferentes tipos de PAMPs, presentes en virus, bacterias, hongos y protozoarios. GP; glicoproteínas, LP; lipoproteínas, PG; peptidoglicanos, LTA; ácido lipoteicoico, GPI; glicoproteínas de anclaje. Tomado y modificado de Mogensen,(2009).

El resultado de la estimulación de estos receptores, es la liberación de varias citocinas proinflamatorias; IL-1, IL-6, IL-10 e IL-12, así como TNF, IFN- α e IFN- γ (Figura 5) (O'Neill y cols., 2009). De esta forma, los TLRs permiten la activación de la respuesta inmune innata y la inducción de señales que llevan a la activación de la respuesta inmune adaptativa (Kaisho y Akira, 2006).

Una señalización persistente en la vía de los TLRs o una expresión disminuida de éstos, son fenómenos que podrían estar involucrados en la patogénesis de entidades inflamatorias, alérgicas o autoinmunes (O'Neill y cols., 2009; Amoudruz y cols., 2009).

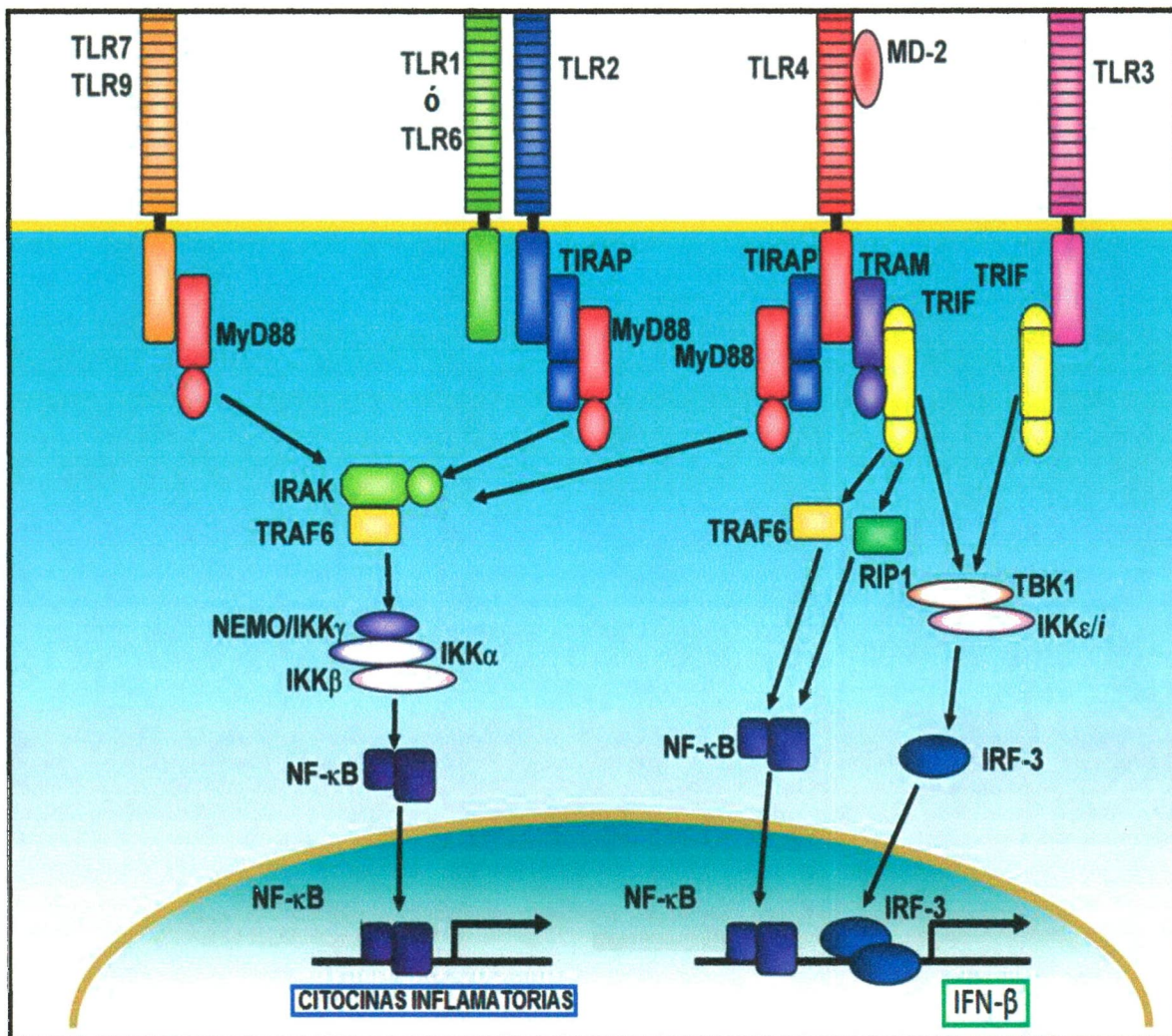


Figura 5. Vía de señalización TLR. La vía de señalización se origina a través del dominio TIR citoplasmático de un TLR específico. El adaptador de dominio TIR, MyD88, se asocia con el dominio citoplasmático de los TLRs, enseguida se recluta IRAK el cual activa TRAF6, llevando a la activación del complejo $\text{I}\kappa\text{B}$ cinasa (IKK) formado por $\text{IKK}\alpha$, $\text{IKK}\beta$ y NEMO/ $\text{IKK}\gamma$. El complejo IKK fosforila a $\text{I}\kappa\text{B}$ generando la translocación de NF- κB hacia el núcleo donde induce la expresión de citocinas inflamatorias. TIRAP, un segundo adaptador de de dominio TIR, está involucrado en la vía de señalización dependiente de MyD88 a través de TLR2 y TLR4. En las vías de señalización mediadas por TLR3 y TLR4, la activación de IRF-3 y la inducción de IFN- β se llevan a cabo en una manera independiente de MyD88. Un tercer adaptador TIR, TRIF, es esencial para la vía independiente de MyD88. Los complejos IKKs y TBK1 median la activación IRF-3 río abajo de TRIF. TRAM, un cuarto adaptador TIR es específico para la vía dependiente de TRIF independiente de MyD88 mediada por TLR4. Tomado y modificado de Takeda y Akira (2005).

En este contexto, existe evidencia de que los TLRs son capaces de reconocer ligandos propios, un claro ejemplo es que la inflamación puede ser inducida en ausencia de patógenos mediante moléculas liberadas por células apoptóticas o por sustancias químicas que provocan daño a tejido (Marsahak-Rothstein, 2006).

TLR2 responde a proteínas de choque térmico, TLR4 a fragmentos de matriz extracelular, fibrinógeno y β -defensina y TLR3 a RNAm, el resultado de una desregulación en estos procesos puede ser inflamación crónica o aguda así como la asociación con algunas enfermedades inflamatorias o autoinmunes como psoriasis, aterosclerosis y LES, entre muchas otras que han sido ligadas a sobreexpresión de IFN- α inducido vía los TLRs (Rifkin y cols., 2005; Denny y cols., 2007; Lande y cols., 2007).

De la misma manera defectos en esta vía se han relacionado con enfermedades de tipo alérgica y esto se cree es debido a una débil estimulación de los TLRs que trae como consecuencia un desbalance en la diferenciación celular Th1-Th2 favoreciéndose la respuesta tipo Th2 generando un aumento en la respuesta de tipo alérgica (Bauera y cols., 2007).

2.1.1 Receptores tipo Toll like y asma

Las evidencias que señalan a los TLRs como moléculas importantes en la patogénesis del asma provienen tanto de estudios de asociación como de estudios en modelos animales. Los estudios de asociación genética en TLRs y asma se han enfocado principalmente al análisis de SNPs en los genes de TLR1 a TLR10 siendo TLR2 y TLR4 los más estudiados (Tabla 3) (Beisswenger y Bals, 2008; Lafferty y cols., 2010).

En este sentido uno de los estudios más completos de asociación de TLRs y asma fue realizado por Kormann y cols. (2008) en población Alemana, en el cual se incluyeron 21 SNPs localizados en 10 miembros de esta familia (TLR1-TLR10) y los únicos genes que no documentaron asociación fueron TLR3, TLR5, TLR7 y TLR8.

Aunado a este estudio existen otros que han evaluado la participación de los TLRs en asma como el realizado por Bjørnvold y cols. (2009), en el cual se demostró que el alelo T del SNP rs3804100 del gen TLR2 en población Noruega confiere riesgo para asma. Así también en un estudio hecho por Bottcher y cols., (2004), se encontró que el polimorfismo Asp299Gly del gen *TLR4* se asociaba con un riesgo 4 veces mayor a padecer la enfermedad en población sueca. En otro estudio realizado por Tantisira y cols., (2004) en población Afroamericana se reportó que el alelo menor del SNP Ser249Pro del gen *TLR6* disminuye el riesgo para padecer asma. En México en un estudio de GWA se evaluaron polimorfismos de *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR6*, *TLR8*, *TLR9* y *TLR10*, sin embargo únicamente resultaron asociados los

polimorfismos rs5743810 de *TLR6* y rs7663239 de *TLR10* (Wu y cols., 2010).

Por otra parte, Chun y cols. (2010) reportaron diferencias significativas en la expresión de *TLR1*, *TLR2*, *TLR6*, *TLR9* y sus genes blancos entre células mononucleares de pacientes asmáticos y controles sanos.

En modelos murinos de asma se ha demostrado que la administración de un agonista de *TLR2* induce el establecimiento de inflamación alérgica en las vías aéreas de estos ratones (Chisholm y cols., 2004; Redecke y cols., 2004), mientras que los ratones deficientes en *TLR4* muestran una respuesta asmática exacerbada cuando se exponen a aerosoles de ovoalbúmina con dosis bajas de lipolisacáridos (Hollingsworth y cols., 2006). Se ha demostrado también que la activación de *TLR9* en ratones, promueve el desarrollo de la respuesta Th1 y que su estimulación con agonistas, modula la inflamación de las vías aéreas y disminuye la remodelación (Jain y cols., 2002).

Recientemente, uno de los receptores que ha sido de gran interés en esta enfermedad es *TLR7*. Este receptor es particularmente importante ya que se encarga del reconocimiento de virus, principales factores ambientales asociados al desarrollo de crisis asmáticas (Chang, 2010).

Tabla 3. Estudios de asociación de SNPs en los genes TLRs

GEN	SNP	POBLACION	AUTOR
TLR1	rs5743594	Alemana (NA)	Kormann y cols., 2008.
	rs5743595	Alemana	
	rs4833095	Alemana	
TLR2	rs4696480	Alemana (NA)	Kormann y cols., 2008.
		Australiana y Germana	Eder y cols., 2004.
	rs1898830	Alemana (NA)	Kormann y cols., 2008.
	rs3804099	Alemana	Kormann y cols., 2008.
	rs5743708	Danesa (NA)	Smit y cols., 2007.
	+2408 G/A	Tunecina	Lachheb y cols., 2008.
rs3804100	Noruega	Bjørnvold y cols., 2009.	
TLR3	rs3775291	Alemana (NA)	Kormann y cols., 2008.
TLR4	rs2737190	Alemana	Kormann y cols., 2008.
	rs10759932	Alemana (NA)	Kormann y cols., 2008.
	rs4986791	Alemana (NA)	Kormann y cols., 2008.
	rs4986790	Caucásica	Yang y cols., 2004.
		Turca	Sackesen y cols., 2005.
	Asp299Gly	Sueca	Bottcher y cols., 2004.
+1196 C/T	Tunecina	Lachheb y cols., 2008.	
+896 A/G	Tunecina	Lachheb y cols., 2008.	
TLR5	rs5744168	Alemana (NA)	Kormann y cols., 2008.
	rs2072493	Alemana (NA)	
	rs5744174	Alemana (NA)	
TLR6	rs5743789	Alemana	Kormann y cols., 2008.
	rs5743810	Alemana	Kormann y cols., 2008.
		Afroamericana	Tantisira y cols., 2004.
		Alemana	Hoffjan y cols., 2005.
	Mexicana	Hu y cols., 2010.	
TLR7	rs179008	Alemana (M)	Kormann y cols., 2008.
		Danesa	Moller-Larsen y cols., 2008.
		Australiana (NA)	McLean y cols., 2009.
	rs5935436	China (M)	Zhang y cols., 2009.
rs5743781	Danesa (NA)	Moller-Larsen y cols., 2008.	
TLR8	rs3761624	Alemana	Kormann y cols., 2008.
	rs2407992	Danesa	Moller-Larsen y cols., 2008.
	-746 A/G	Australiana (NA)	McLean y cols., 2009.
TLR9	rs187084	Alemana	Kormann y cols., 2008.
	rs5743836	Alemana (NA)	Kormann y cols., 2008.
	-1237 T/C	Costa rica (NA)	Lange y cols., 2011.
		Europeos americanos	Lazarus y cols., 2003.
	Tunecina	Lachheb y cols., 2008.	
TLR10	+1031 G/T	Europeos americanos	Lazarus y cols., 2004.
	+2322 A/G	Europeos americanos	Lazarus y cols., 2004.
	rs11096956	Europeos americanos	Lazarus y cols., 2004.
	rs4274855	Europeos americanos	Lazarus y cols., 2004.
	rs4129009	Alemana	Kormann y cols., 2008.
	rs7663239	Mexicana	Hu Hao. et al, 2010.

NA: no asociado, M: asociado en población masculina.

2.2 Receptor Toll like 7 (TLR7)

El receptor TLR7 se localiza en la superficie de los endosomas y reconoce RNA de cadena sencilla procedente de virus. TLR7 consta de un dominio intraendosomal rico en repetidos de leucina (N-terminal), que le confiere la especificidad para su ligando, un dominio transmembranal y un dominio citosólico denominado TIR (C-terminal), el cual es similar al dominio intracelular del receptor de Interleucina-1 (Kawai y Akira, 2010; Chang, 2010). El gen *TLR7* se encuentra localizado en el cromosoma Xp22.3 y codifica para una proteína de 1049 aa de 120.92 kDa. Este gen se expresa en diversos órganos incluyendo pulmón, placenta, bazo, ganglios linfáticos y amígdalas, así como en diferentes tipos celulares (macrófagos, neutrófilos, linfocitos B), principalmente en células dendríticas plasmacitoides (CDps) (genecards.org).

La activación de TLR7 induce un aumento en la expresión de los interferones IFN- α y β , así como de las citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-12. La ruta de señalización de TLR7 incluye la activación de los factores de transcripción IRF7 (factor 7 de respuesta a IFN) y NF- κ B. Ambas vías son dependientes de la proteína adaptadora MyD88 (proteína 88 primaria de diferenciación mieloide), a la cual se une IRF7 formando un complejo multiproteico de señalización con las proteínas IRAK4, TRAF6, TRAF3, IRAK1 e IKK α , lo que termina en la fosforilación de IRF7. Este mecanismo permite la translocación de IRF7 al núcleo y la transcripción de sus genes blanco (IFN, IL-6 e IL-12) (Kawai y Akira, 2010; Crozat y Beutler, 2004). A su vez la transcripción de INF induce la expresión de genes que inhiben la replicación viral (Figura 6) (Crozat y Beutler, 2004; Yamamoto y Takeda, 2010).

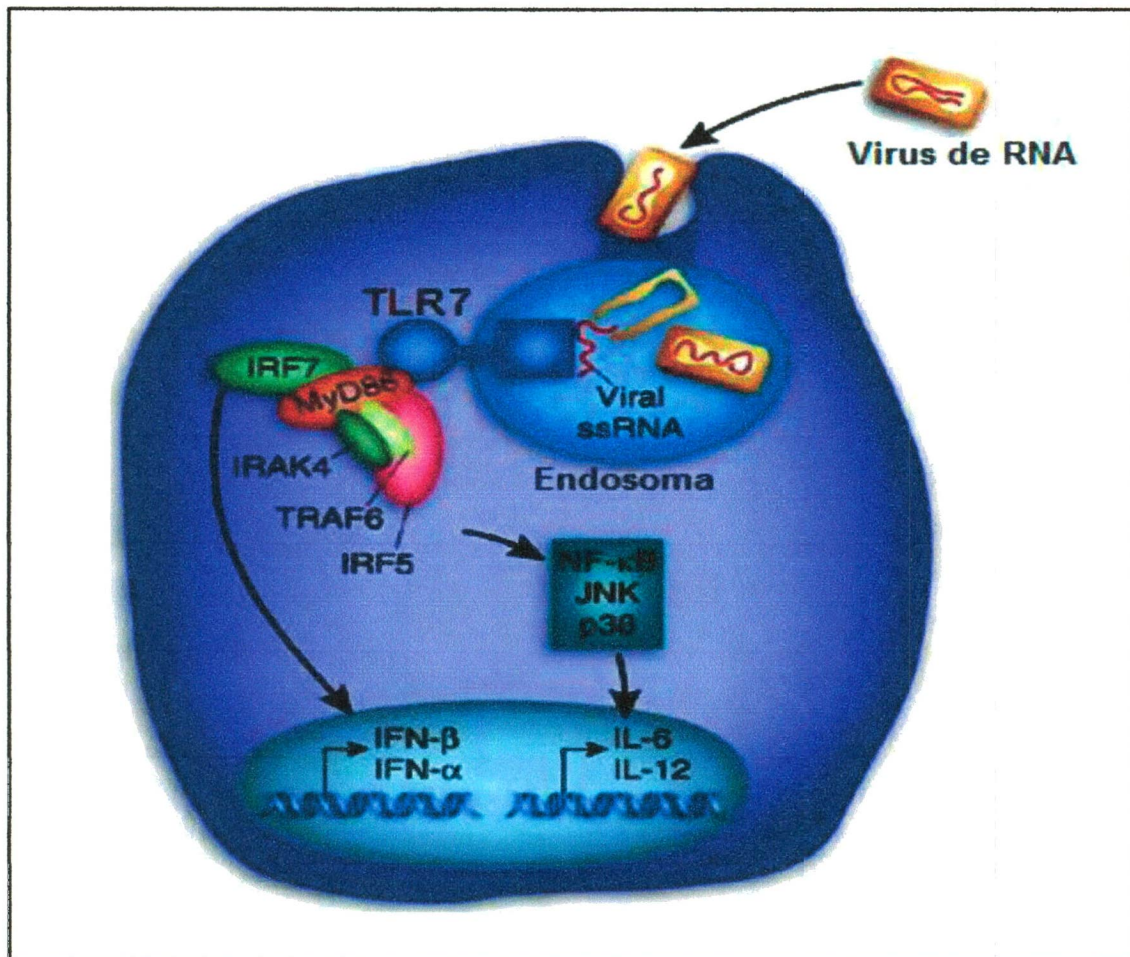


Figura 6. Vía de señalización mediada por TLR7. La vía de TLR7 es inducida mediante RNA viral de cadena sencilla y se lleva a cabo de una manera dependiente de MyD88 para regular la respuesta inflamatoria activando a NF-κB y AP-1. MyD88 forma un complejo de señalización con IRAK1 e IRAK4. En respuesta a la estimulación mediante el ligando, IRAK1 fosforila a IRF7, permitiendo que se dimerice y sea translocado al núcleo, adicional a éste paso también se requiere de la ubiquitinación de IRF7 para su activación mediante TRAF6. IRF7 junto con NF-κB y AP-1 regulan la expresión de Interferón tipo I, incluyendo IFN α e IFN β y citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-12. Tomado y modificado de Benedict y Ware (2005).

2.2.1 Papel del gen *TLR7* en la etiopatogenia del asma

Algunos de los estudios que sugieren que *TLR7* está directamente involucrado en la patogénesis del asma, incluyen los realizados en modelos murinos. Moisan y cols. (2006) demostraron que ratones tratados con un ligando sintético de *TLR7* (S-28463) previene el desarrollo del fenotipo asmático, resultando en la reducción de la infiltración de leucocitos en pulmón, principalmente eosinófilos, además de una disminución en los niveles de IgE y citocinas tipo Th2 como IL-4, 5, 6 y 13. En otro estudio realizado en ratones *TLR7*^{-/-} con fenotipo asmático inducido con ovoalbúmina, se determinó que la respuesta alérgica no podía ser suprimida al administrar ligandos de *TLR7* (R-848), sin embargo en los ratones silvestres se observó al igual que en el estudio anterior, una supresión de la respuesta Th2 dependiente de INF γ (Xirakia y cols., 2010).

A pesar de las evidencias experimentales de la participación de *TLR7* en asma, los estudios de asociación entre SNPs de este gen y asma son escasos, de hecho solamente se han evaluado 3 SNPs (rs5743781, rs5935436, rs179008) de este gen (Møller-Larsen y cols., 2008; Zhang y cols., 2009; McLean y cols., 2009).

El rs5743781 (C/T) fue analizado en población Danesa, sin embargo no se documentó asociación con la enfermedad (Møller-Larsen y cols., 2008). Por su parte, el rs5935436 (C/T) se encontró asociado con protección (OR= 0.126, 95% CI; 0.016-0.995) con el género masculino en población China (Zhang y cols., 2009).

El rs179008 (A/T) se ha analizado en tres poblaciones: Australiana (McLean y cols., 2009), Alemana (Kormann y cols., 2008) y Danesa (Møller-Larsen y cols., 2008). En las dos primeras no se reportó asociación con asma, sin embargo en la población Danesa se documentó asociación con el género masculino. En esta población también se reportó la asociación entre asma y un haplotipo conformado por los alelos ancestrales (TG) del rs179008 de *TLR7* y el rs2407992 del gen *TLR8*, el cual se encuentra aledaño a *TLR7* (Møller-Larsen y cols., 2008). El SNP rs179008 es un SNP no sinónimo que cambia una Gln por una Leu en la posición 11, dado que éste aminoácido se encuentra localizado en el péptido señal, se ha sugerido que esta variante puede estar afectando la translocación de TLR7 desde el retículo endoplasmático (RE) hacia el endosoma (Møller-Larsen y cols., 2008; Barton y Kagan, 2009). Por otra parte, es probable que otras variantes moleculares que a la fecha no han sido analizadas, estén contribuyendo en la patogénesis del asma ya que los resultados de asociación entre SNPs en *TLR7* y asma no han sido consistentes y reproducibles.

De manera interesante, Roponen y cols., (2010), reportaron una actividad reducida de la vía TLR7 en células mononucleares de sangre periférica de adolescentes asmáticos comparado con lo que se observó en sujetos sanos. Se ha demostrado que polimorfismos moleculares localizados en regiones reguladoras del gen, en regiones codificantes o CNVs pueden afectar los niveles de expresión de las proteína o su actividad. En este sentido, en un estudio realizado en nuestro grupo de

investigación, en niños mexicanos con lupus eritematoso sistémico se demostró una correlación directa entre el número de copias del gen *TLR7* y su expresión, así como también con la expresión de su gen blanco ($\text{IFN-}\alpha$) (García Ortiz y cols., 2010). Considerando lo anterior, es posible que este tipo de polimorfismos en el gen *TLR7* tengan un papel importante en la etiología de entidades alérgicas como el asma.

II. JUSTIFICACIÓN

El asma es una de las enfermedades crónicas más comunes en el mundo, actualmente se estima que aproximadamente 300 millones de personas la padecen. En la última década, la prevalencia del asma en México ha ido en aumento y es una de las primeras causas de atención como urgencia pediátrica, lo que aunado a los altos costos de su atención, la convierten en un importante problema de salud pública.

Múltiples evidencias, sugieren que SNPs en genes que codifican para componentes de la respuesta inmune innata, dentro de los cuales se encuentran los miembros de la familia TLR contribuyen a la susceptibilidad a asma, sin embargo la contribución de las CNVs se desconoce. Así, determinar el papel que tienen estas variantes genéticas en el riesgo a padecer asma, no sólo incrementará el entendimiento de los mecanismos patogénicos de la enfermedad, sino que además puede contribuir a la identificación de nuevos agentes terapéuticos en el tratamiento de la misma.

III. HIPÓTESIS

El bajo número de copias en el gen *TLR7* es un factor genético de riesgo en el desarrollo del asma.

IV. OBJETIVOS

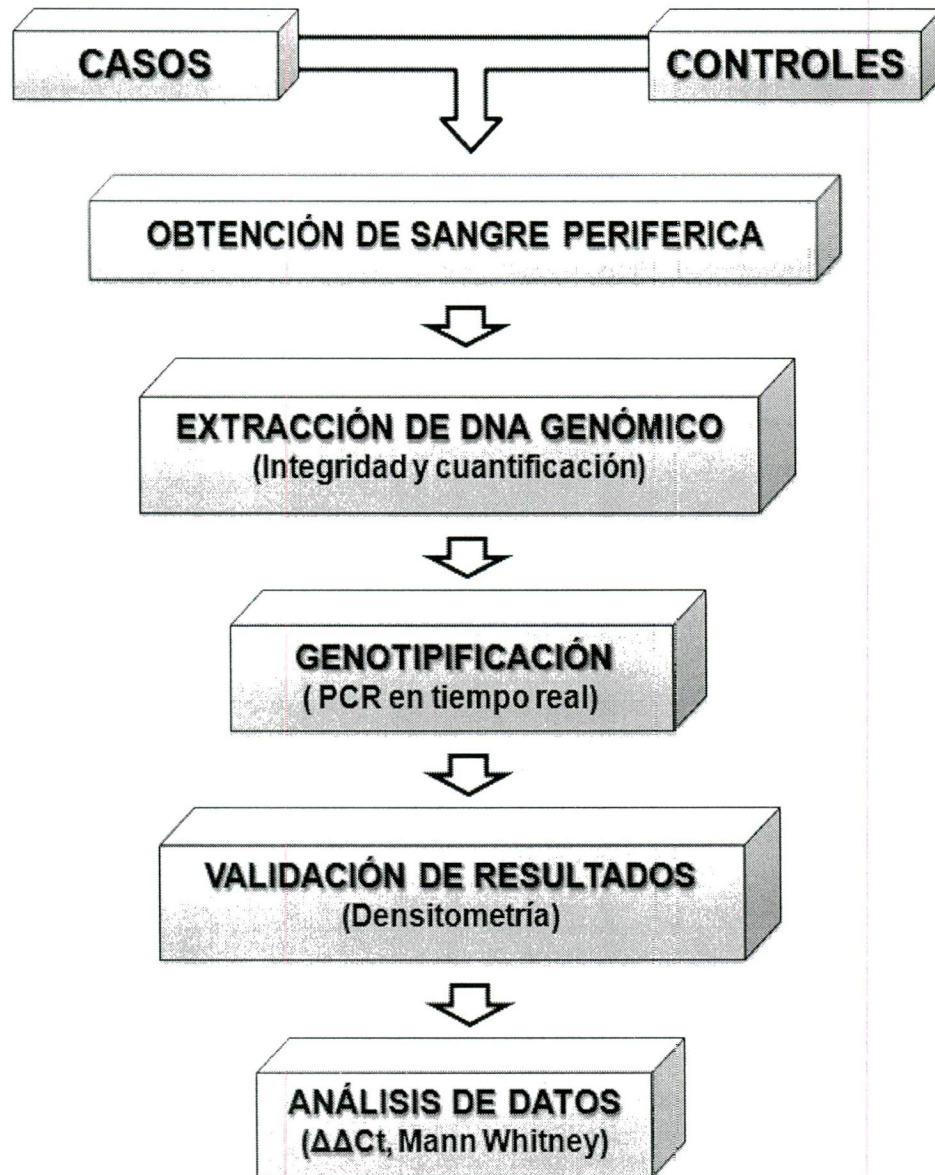
1. OBJETIVO GENERAL

Determinar si variaciones en el número de copias en el gen *TLR7* participan en la etiología del asma.

2. Objetivos específicos:

- Determinar el número de copias del gen *TLR7* en una población mexicana.
- Evaluar la relación entre género y CNVs en el riesgo a padecer la enfermedad.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VI. METODOLOGÍA

1. Tipo de estudio

Casos y controles, transversal, observacional, descriptivo y comparativo.

2. Población de estudio

Los casos fueron pacientes provenientes de 4 Instituciones de Salud de tercer nivel de la Cd. de México. Todos los casos cumplieron con los criterios diagnósticos establecidos por la Iniciativa Global para el Asma (GINA) y estos fueron evaluados por un médico alergólogo quien llenó la hoja de captación de datos y la carta de consentimiento informado. Los controles fueron obtenidos del banco de ADN del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

2.1 Criterios de inclusión y de exclusión

Los pacientes incluidos fueron > 5 y < 17 años con diagnóstico clínico y funcional de asma (espirometría) y que aceptaron firmar la carta de consentimiento informado (Anexo 1). Se excluyeron aquellos casos con diagnóstico de otra enfermedad crónica concomitante, como Fibrosis Quística, Tuberculosis, Fibrosis pulmonar, etc. Así también se excluyeron a los participantes que una vez tomada la muestra decidieron dejar el estudio y aquellos con enfermedades infectocontagiosas, dado que el laboratorio no contaba con la infraestructura necesaria para el manejo de

estas entidades.

Las muestras de controles, provinieron de individuos sanos no relacionados > 18 años sin antecedentes de asma, alergia o entidades autoinmunes. Dado que el genotipo evaluado no es dependiente de la edad, los controles fueron mayores de 18 años para disminuir la probabilidad de seleccionar individuos con susceptibilidad a padecer asma u otra entidad atópica.

Solo se incluyeron pacientes y controles mestizos mexicanos, es decir individuos nacidos en México que no refirieron antecedentes directos de una ancestría distinta a la mexicana (al menos tres generaciones antes). En ambos grupos se eliminaron las muestras de ADN que no contaron con los criterios de calidad técnica (pureza e integridad). El estudio contó con la aprobación de los comités de ética de las Instituciones participantes.

3. Muestras biológicas y extracción de ADN genómico

De cada participante se tomaron 5 ml de sangre periférica en un tubo vacutainer con EDTA como anticoagulante mediante punción venosa. Se hizo la separación de los leucocitos centrifugando los tubos vacutainer a 3000 rpm durante 10 min, posteriormente se separo la capa de leucocitos y se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml, las células fueron lavadas con 10 ml de solución de lisis de eritrocitos y centrifugadas a 3000 rpm por 10 min para obtener el botón de leucocitos, a partir de

los cuales se realizó la extracción de ADN genómico con el kit Qiamp DNA Blood Max (QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden, Germany). Se adicionaron 3 ml de solución de lisis celular al tubo conteniendo el botón de leucocitos, agito en vortex durante 1 min hasta resuspender por completo las células. Posteriormente se agregó 1 ml de solución precipitadora de proteínas, se agitó vigorosamente en el vórtex durante 1 min y se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml, al cual se le agregó 5 ml de isopropanol, se agito suavemente por inversión para precipitar el ADN, finalmente se centrifugo a 3500 rpm durante 10 min y se elimino el sobrenadante y el ADN fue resuspendido con 500 ul de buffer TE (TEKNOVA)

3.1 Cuantificación y evaluación de la integridad del ADN

La cuantificación del ADN se realizó en un espectrofotómetro (NanoDrop-ND-1000 Spectrophotometer) y la lectura de las absorbancias se realizo a una longitud de onda de 260 nm. Las concentraciones se determinaron automáticamente en ng/ μ l de la siguiente manera, tomando en cuenta el valor de DO (densidad óptica) a 260 nm y la constante para ADN de 0.05. La pureza de las muestras, se determinó mediante la relación DNA/proteína con las absorbancias de 260/280, una relación \geq a 1.6 fue tomada como aceptable. Posteriormente se prepararon las muestras de trabajo a una concentración final de 10 ng/ μ L.

La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al

1% teñidos con bromuro de etidio. Los geles se cargaron con 1 µl de ADN y 3 µl de bromofenol y se corrieron a 100 volts/30 min en solución de TBE 1X. Los geles se observaron en un transiluminador con luz UV.

4. Análisis molecular

4.1 Determinación de CNVs

La determinación de CNVs se realizó por PCR en tiempo real, se usaron dos pares de iniciadores para amplificar a *TLR7* (*TLR7-1* y *TLR7-2*) y un par de iniciadores para cada uno de los genes utilizados como controles endógenos; *TBP* (proteína de unión a caja TATA) y *NEMO* (modulador esencial de *NFKB*).

Los dos pares de iniciadores empleados para la amplificación del gen *TLR7*, se reportaron por García y cols., (2010), los cuales amplifican regiones del exón 3; *TLR7-1*(F:5'-GGCTAGATGGTTTCCTAAACTCT-3' y R:5'-GGTACACAGTTGCATCTGAAATCG-3'). El segundo par, *TLR7-2* (F:5'-TCAGCCACAACCAACTGACCAC-3' y R: 5'-GCAACATCTTCAGATTGTTGAGGAC-3'), se empleó para la validación de los resultados en al menos el 50% de la población, los cuales se localizaron a 1.8 Kb del primer par de iniciadores (Figura 7).

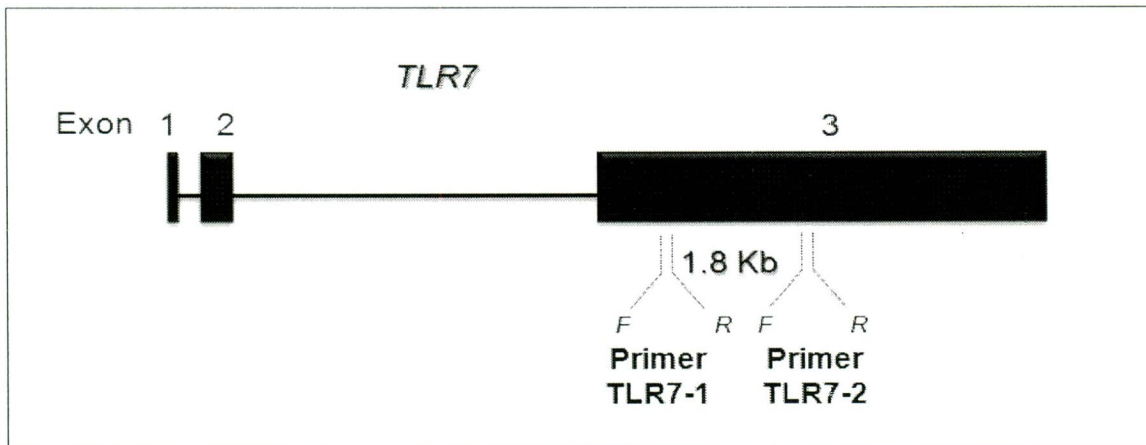


Figura 7. Diseño y localización de los iniciadores específicos para el gen *TLR7* para el análisis de CNVs. Los pares de primers permitieron amplificar dos segmentos de *TLR7*, separados por 1.8 Kb.

La amplificación de los dos segmentos de *TLR7* y los genes endógenos se realizó bajo las mismas condiciones de reacción. Para cada reacción se agregaron 20ng de ADN, 50pmoles de cada primer, 1U de AmpliTaq Gold polimerasa, 0.4µl de dNTPs a 12mM, 0.6µl de $MgCl^2$ a 4mM y 1 ul de SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystem Foster City, CA, USA) en un volúmen final de 10µl.

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones de amplificación: 95°C por

10min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15s, 60°C por 15s y 72°C por 30s (Tabla 4). Todas las muestras se hicieron por triplicado y el cálculo del número de copias se realizó mediante el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta Ct$. Un control sano del género femenino portador de dos copias del gen *TLR7* fue utilizado como calibrador y como referencia para evaluar el cambio relativo de dosis génica.

Tabla 4. Condiciones de amplificación RT-PCR.

Tm	Tiempo	Ciclos
95°C	10min	
95°C	15s	40
60°C	15s	
72°C	30s	

Se realizaron varias curvas estándar hasta que las eficiencias de amplificación tanto para *TLR7* como para los genes endógenos fueran similares. Para la generación de las curvas estándar se hicieron seis diluciones seriadas de ADN genómico del calibrador a partir de 40ng (20ng, 10ng, 5ng, 2.5ng, 1.25ng). Para obtener resultados exactos y reproducibles, se buscó que las reacciones contaran con un grado de eficiencia cercano al 100% con una pendiente equivalente entre -3.6 a -3.1, La medida de reproducibilidad (valor de R^2) fue establecida en valores

mayores a 0.98 (valor ideal: $R^2 = 1$).

4.2 Validación de CNVs

La validación del número de copias se llevó a cabo mediante PCR semicuantitativa. Para ello se realizó una PCR dúplex con *TBP* y *TLR7-1* en 20 casos y 20 controles, bajo las siguientes condiciones de reacción: 95°C por 10min, seguido de 28 ciclos a 95°C por 15s, 60°C por 15s y 72°C por 30s. Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 3% teñidos con bromuro de etidio. El análisis densitométrico fue llevado a cabo con el software Kodak Molecular Imaging V4.0.

4.3 Análisis estadístico

Para comparar la distribución relativa del número de copias entre casos y controles, se empleó la prueba no paramétrica de U Mann-Whitney usando los valores de número de copias relativas obtenidas del análisis $\Delta\Delta Ct$. Este análisis fue realizado con el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA).

Los riesgos relativos (ORs) con un intervalo de confianza de 95%, se estimaron bajo un modelo de regresión logística, usando los valores absolutos de número de copias y tomando en cuenta al genotipo como variable predictora y al género como

covariable. Se determinaron categorías de referencia para el análisis: en el caso del grupo femenino las categorías fueron; < 2 copias, > 2 copias y para el grupo masculino se creó la categoría de; > 1 copia. En ambos casos, estas categorías fueron determinadas de acuerdo al máximo y mínimo número de copias observado en cada grupo.

Por otra parte, se evaluó el índice de correlación intraclase, para determinar el nivel de concordancia entre los resultados obtenido por PCR en tiempo real y los obtenidos por densitometría. El paquete estadístico empleado para ambos análisis fue SPSS v.16.

VII. RESULTADOS

1. Población analizada

Se realizó un estudio de asociación caso-control pareado por género, en el que se incluyeron 314 pacientes y 314 controles, de los cuales 180 (57%) fueron del género masculino y 134 (43%) de género femenino. Los pacientes presentaron una edad promedio de 10.8 años (sd \pm 2.9) .

2. Estudio molecular

2.1 Evaluación de la integridad del ADN

La técnica utilizada para la genotipificación de las CNVs es una técnica cuantitativa muy sensible, y se requirió que el ADN empleado tuviera buena integridad para que este factor no afectara los resultados. La integridad de las 628 muestras se consideró adecuada cuando se observó una banda definida con alto peso molecular, las muestras que presentaron patrones de barrido fueron descartadas para análisis subsecuentes (Figura 8).

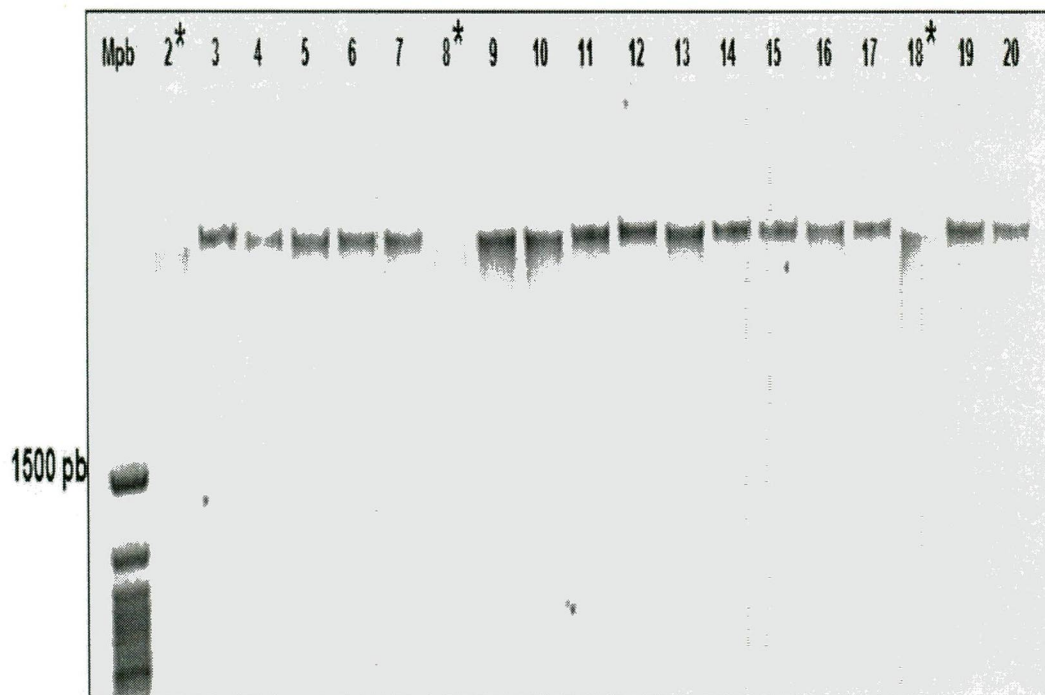


Figura 8. Análisis de integridad de ADN. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de pares de bases; carril 2-11: ADN de pacientes; carril 12-20: ADN de controles. *muestras excluidas del análisis.

2.2 Evaluación de la eficiencia de la reacción

La determinación del número de copias se realizó por RT-PCR y mediante el método $\Delta\Delta Ct$. Dicho método fue validado, es decir nos aseguramos que las eficiencias de reacción tanto del gen de interés (*TLR7*) como las de los controles endógenos (*TBP* y *Nemo*) fueran similares.

Para el gen *TBP* se obtuvo una pendiente de -3.60, para el caso de *NEMO* de -3.56, para *TLR7-1* de -3.61 y para *TLR7-2* de -3.55, así también el valor de correlación para los 4 casos fue de $R^2 = 0.99$. Todos los parámetros estuvieron dentro de los rangos establecidos (Figura 9).

Por otra parte el carácter paralelo de las curvas *TBP* vs *TLR7-1*, *TLR7-2* y *Nemo* vs *TLR7-1*, *TLR7-2* indicó eficiencias de amplificación similares, por lo tanto empleamos el método $\Delta\Delta Ct$ para evaluar el número de copias

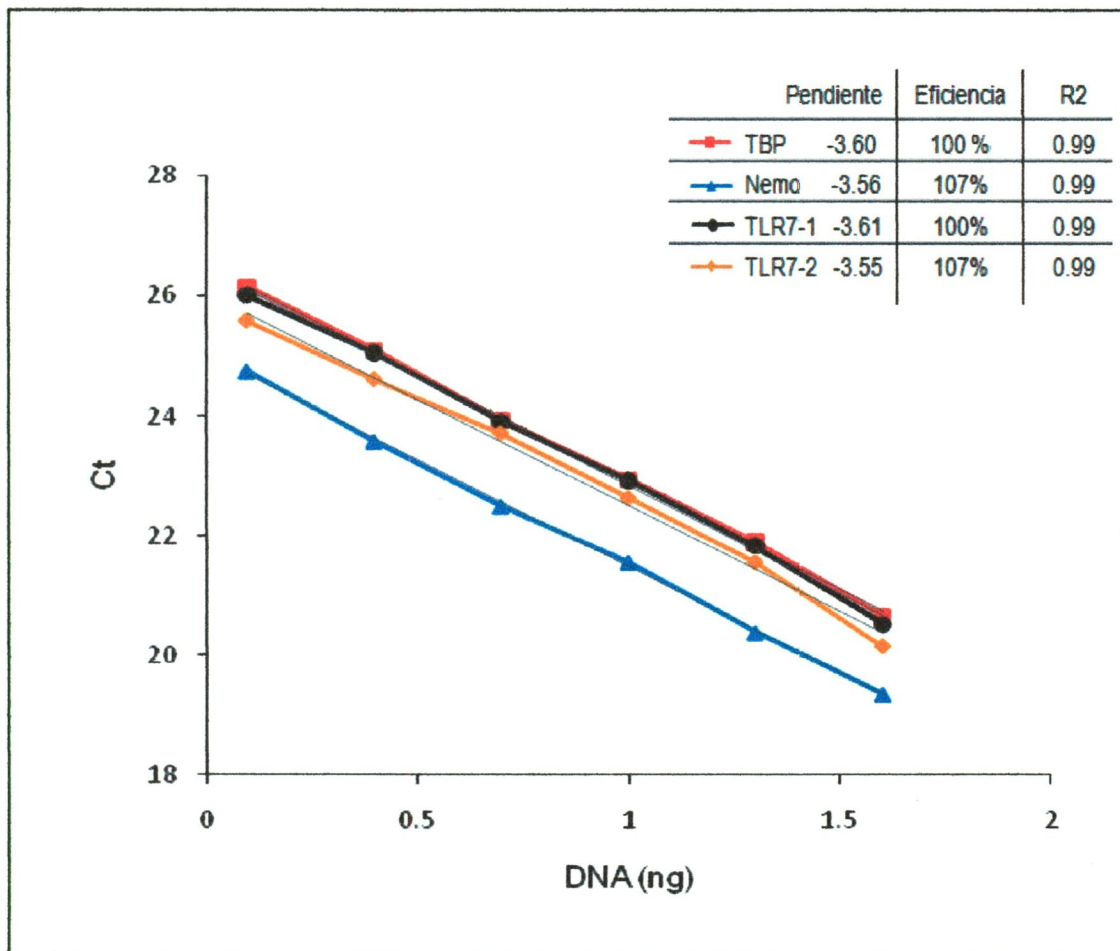


Figura. 9. Gráfica de eficiencias de amplificación. La curva estándar para TBP se muestra en rojo, para Nemo en azul, para TLR7-1 en negro y para TLR7-2 en naranja. Las rectas corregidas para cada una de ellas se muestra en gris.

2.3 Validación de CNVs

Los resultados del número de copias obtenidos por RT-PCR fueron validados por PCR semicuantitativa. Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 3% teñidos con bromuro de etidio, se observaron las bandas a 228 pb para el producto de amplificación de *TLR7* y a 151 pb para TBP (Figura 10).

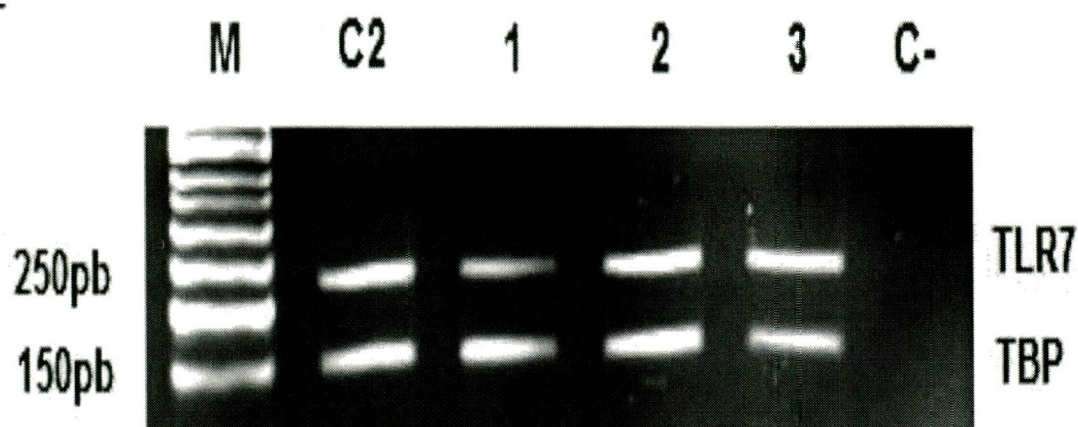


Figura 10. *Determinación del número de copias de TLR7 mediante PCR semicuantitativa.* Electroforesis en geles de agarosa al 3% de los productos de PCR de TBP y TLR7, Carril 1: Marcador ADN de 50 pb ; Carril 2: Individuo con 1 copia; Carril 3: Individuo con 2 copias; Carril 4: Individuo con 3 copias; Carril 5: Control negativo .

Los picos densitométricos se graficaron y se obtuvieron las intensidades de las bandas tanto de TLR7 como de TBP (Figura 11).

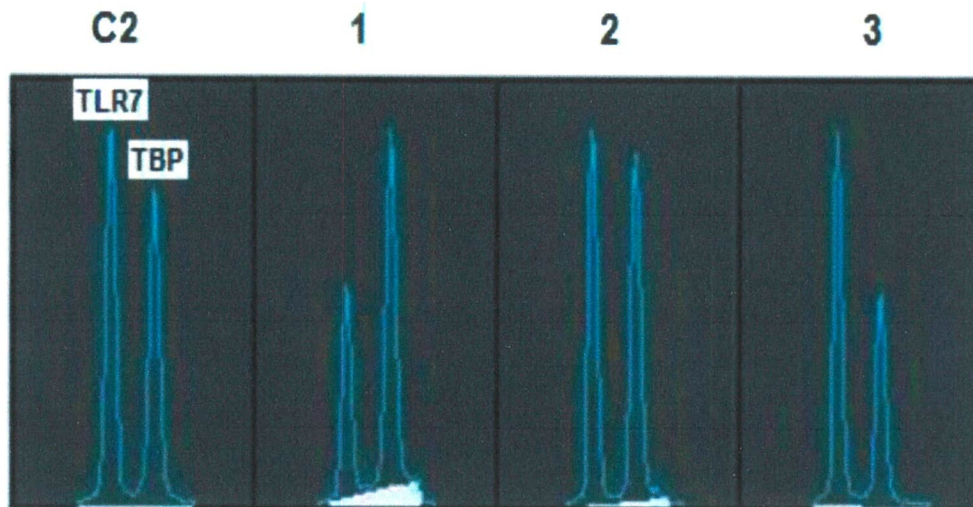


Figura 11. Gráfica de picos densitométricos. El pico de la izquierda corresponde al análisis densitométrico de TLR7 y el de la derecha a TBP, los números de arriba corresponde al NC estimado y C2 es un control de 2 copias.

La intensidad de las bandas de TLR7-1 se normalizaron con la intensidad de la banda de TBP, con base en esto se determinó el número de copias relativo de TLR7 (Figura 12).

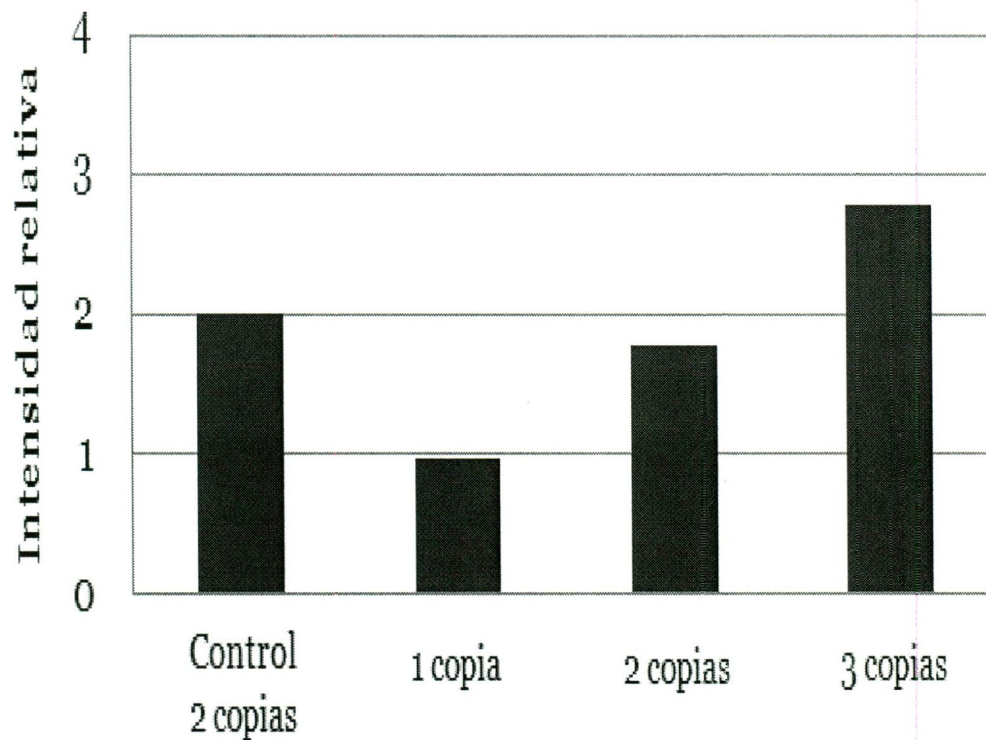


Figura 12. Estimación del NC mediante densitometría. Representación gráfica de la intensidad relativa de individuos con diferente NC. Los valores graficados fueron normalizados con respecto a TBP.

El cálculo del coeficiente de correlación intraclase entre ambos métodos (PCR en tiempo real vs PCR semicuantitativa) fue de 0.972 (IC 95% 0.949-0.985; $p < 0.0001$) lo que demostró una buena reproducibilidad de resultados ya que valores > 0.71 son aceptables.

2.4 Análisis de genotipificación

Del análisis de 896 cromosomas (448 casos y 448 controles), 186 casos (59.2%) y 181 controles (57.6%) tenían una copia del gen *TLR7*, 127 casos (40.5%) y 132 controles (42%) dos copias y un solo paciente (0.30%) presentó tres copias, al igual que en los controles. El análisis de la distribución del número de copias relativo entre casos y controles no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.8265$).

Al estratificar por género, en la población femenina se identificó un paciente (0.74%) y un control (0.74%) con tres copias, 126 casos (94.02%) y 132 controles (98.5%) con dos copias y 7 pacientes (5.22%) vs un individuo sano (0.74%) con una copia (Figura. 13). El análisis de asociación mostró diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.0449$).

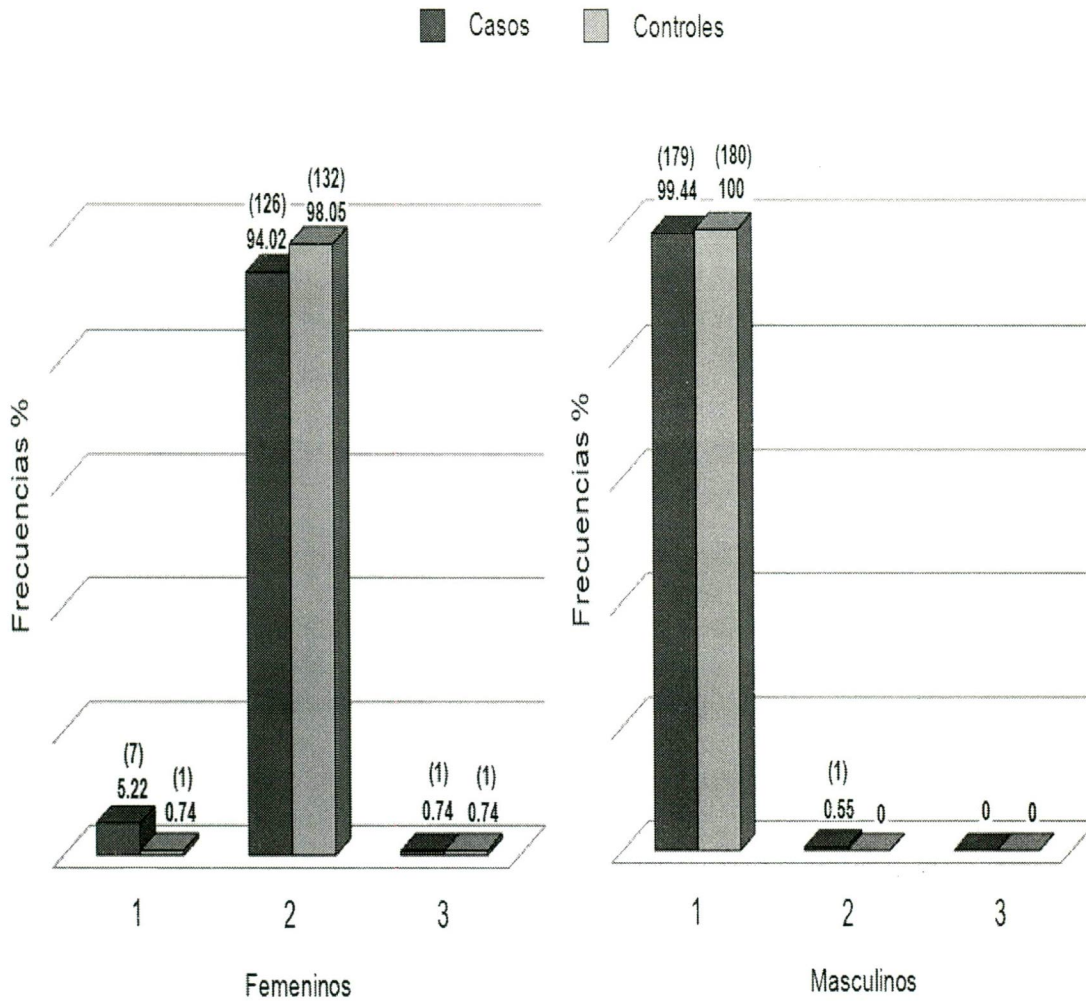


Figura 13. Frecuencias de los CNVs del gen TLR7 en la población mexicana.

Gráfica de frecuencias del número de copias en la población femenina estratificado por género. Las barras gris oscuro representan los casos y las claras los controles. Sobre el eje de las X se grafican los números de copias y sobre el eje de las Y las frecuencias, entre paréntesis se muestran el número de individuos con el número de copias respectivo.

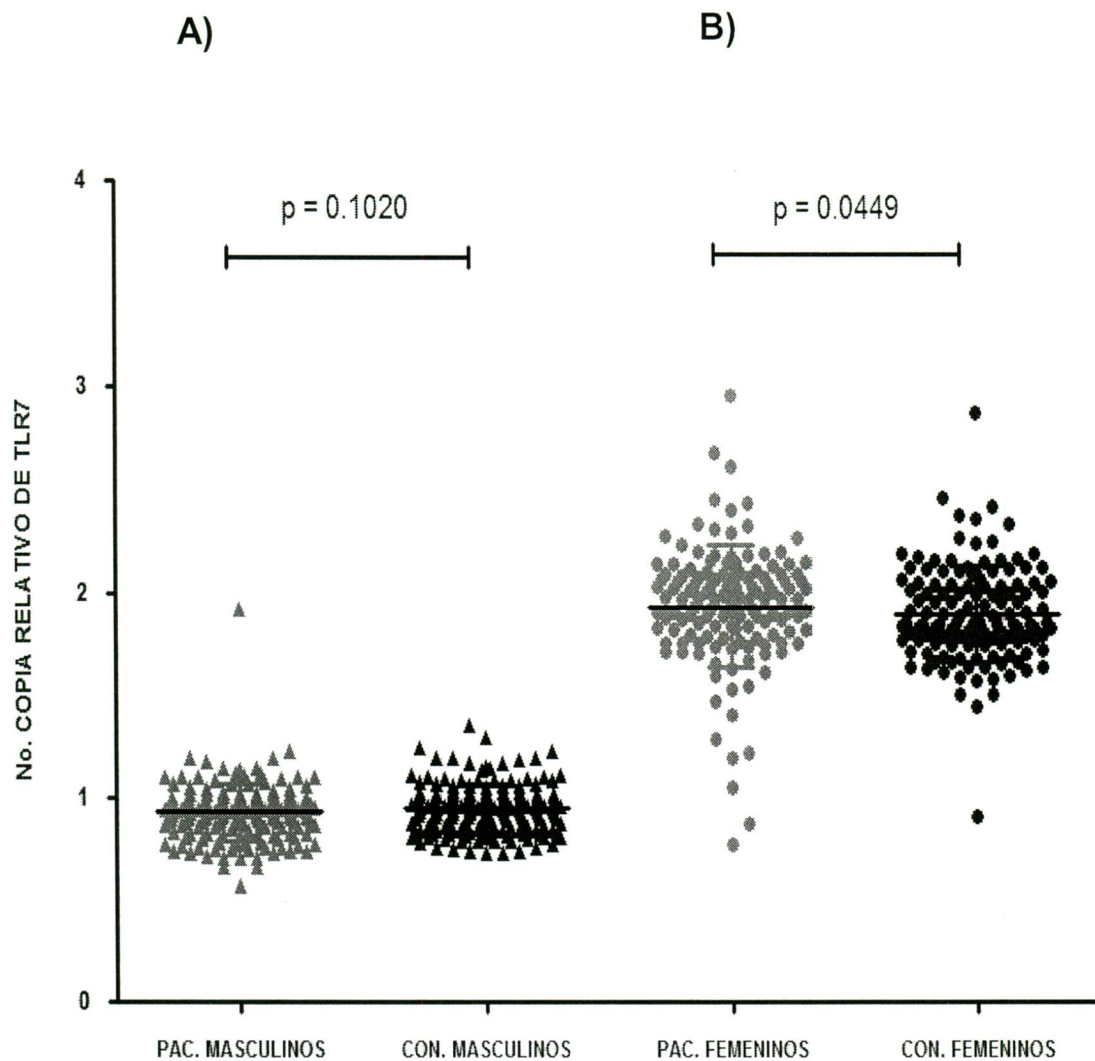


Figura 14. Distribución relativa del número de copias entre casos y controles. El no. de copias de TLR7 fue determinado por PCR en tiempo real y normalizados con TBP. En gris se representan a los pacientes y en negro a los controles A) Análisis de la distribución del NC entre casos y controles del género masculino. B) Análisis de la distribución del No.de copias relativo entre casos y controles del género femenino.

El análisis de regresión logística usando el número absoluto de copias de *TLR7* en el género masculino mostró que portar >1 copia no confiere riesgo a padecer la enfermedad ($p= 1.0$).

De igual manera los resultados derivados del análisis de la población femeninas en la categoría de > 2 copias no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0.974$). Sin embargo en la categoría de < 2 copias se obtuvo un valor de p con tendencia a la significancia ($p=0.064$), además el análisis demostró que una disminución en el número de copias (< 2) confiere un OR de 7.33 (IC 95% 0.890-60.45), por lo que se puede inferir que las niñas con un número de copias < 2, tienen 7 veces más el riesgo a padecer asma (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de riesgo relativo.

Grupo	No. copias	Casos n (%)	Controles n (%)	OR (IC 95%)	p
Masculinos N=180	>1	1 (1.1)	0 (0)	1.0 (0.139-7.17)	1.0
Femenino N=134	>2	1 (0.74)	1 (0.74)	1.04 (0.65-16.92)	0.974
	<2	7 (5.22)	1 (0.74)	7.33 (0.890-60.45)	0.064

VII. DISCUSIÓN

El asma es considerada como un problema de salud pública por su impacto socio-económico. Ésta es una enfermedad de origen multifactorial, cuya complejidad está determinada por la gran variedad de tipos, elementos celulares y la multitud de vías de señalización que contribuyen en su desarrollo, entre ellas la ruta de señalización mediada por los receptores TLRs (O'Neill y cols., 2009; Amoudruz y cols., 2009).

La ruta TLR juega un papel fundamental, en el reconocimiento de agentes desencadenantes de exacerbaciones asmáticas, las bacterias, hongos y principalmente virus (Beisswenger y Bals, 2008). Los TLRs 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10 y 11 reconocen lipopolisacáridos derivados de bacterias, mientras que TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 o DNA y RNA de cadena sencilla, en el proceso de defensa del hospedero (Mogensen, 2009).

Está ampliamente demostrado que una función anormal de estos receptores, puede conducir al desarrollo de entidades inmunes como el asma. Estudios recientes, han evidenciado un inadecuado funcionamiento de la inmunidad innata anti-viral en pacientes asmáticos. Por ejemplo, en cultivos de células epiteliales bronquiales de pacientes asmáticos y de controles sanos, que son infectadas con rinovirus, se demostró que las células de los pacientes, comparada con las de controles sanos, producen niveles más bajos de IFN- β , una de las principales

citocinas que conjuntamente con el IFN- α son expresadas en respuesta a la activación de TLR7, IFN- β e inducen un microambiente antiviral, a través de la estimulación de la expresión de genes inducibles por INF (Wark y cols., 2005).

De manera interesante, también se ha documentado que en leucocitos circulantes extraídos de pacientes asmáticos que son cultivados e infectados con virus sincicial respiratorio, existe una capacidad deficiente para la síntesis de IFN- α (Gehlhar y cols., 2006).

TLR7 es un candidato interesante para asma, ya que es particularmente relevante en el reconocimiento de virus, los cuales son los principales factores ambientales asociados al desarrollo de crisis asmáticas, varios reportes han documentado que existe un funcionamiento anormal del receptor en la presencia de asma (Roiponen y cols., 2010).

Se propone que polimorfismos en TLR7 podrían estar involucrados, afectando los niveles de expresión del gen. De hecho en cultivo de células mononucleares de sangre periférica de pacientes chinos con LES se determinó que el alelo G de riesgo de la variante rs3853839 ubicado en la 3'UTR del gen TLR7, se asocia a niveles más elevados del transcrito al compararlo con el alelo ancestral C (Kawasaki y cols., 2011). Tomando en cuenta las evidencias, el objetivo de nuestro estudio fue determinar si variaciones en el número de copias en el gen *TLR7* participan en la etiología del asma.

En el análisis de 314 casos y 314 controles, los resultados revelan diferencias significativas en la distribución de número de copias relativo de *TLR7* entre casos y controles, de manera dependiente del género (femenino) ($p= 0.0449$), aunado a estos datos, el análisis de regresión logística mostró que en pacientes femeninos tener menos de dos copias del gen *TLR7* puede ser un factor de riesgo para desarrollar asma (OR= 7.33, IC 95% 0.890-60.45, $p= 0.064$). Aunque el poder estadístico de nuestro análisis es bajo y es necesario aumentar la población de análisis para confirmar estos hallazgos, nuestros resultados sugieren que un bajo número de copias en *TLR7* se traduciría en la disminución de la expresión del gen en los pacientes, contribuyendo con ello al desarrollo de asma.

Se propone que una expresión reducida de *TLR7*, favorecería una respuesta alérgica como resultado de una constante estimulación Th2, ya que de manera normal las principales citocinas características de respuesta Th1 (IFN- α , IFN- β e IL-12) que se producen cuando TLR7 es estimulado, funcionan como reguladores negativos de la diferenciación Th2 y de la respuesta alérgica, así que una disminución en la expresión de TLR7, afectaría la concentración de estas citocinas y tendría como consecuencia un aumento en la respuesta Th2. Esta hipótesis es concordante con lo observado por Ropopen y cols., (2010), quienes reportaron una actividad reducida de la vía TLR7 en células mononucleares de sangre periférica de adolescentes asmáticos, comparado con lo observado en sujetos sanos.

Además se ha demostrado que en modelos animales de asma que son tratados con agonistas de TLR7, se presenta una inhibición eficaz de la reacción inflamatoria

en respuesta a un alérgeno (Moisan y cols., 2006; Camateros y cols., 2007).

Cabe destacar que a la fecha, nuestro estudio es el único que ha evaluado las variaciones en el número de copias del gen *TLR7* en pacientes asmáticos, sin embargo la existencia de CNVs en este gen se ha documentado en estudios de asociación en pacientes con lupus eritematoso sistémico (García-ortíz y cols., 2010; Camateros y cols., 2007). De hecho García-Ortíz y cols. encontraron correlación entre el número de copias de *TLR7* y los niveles de expresión del mismo, así como con los niveles de expresión de IFN- α .

Asma y LES son enfermedades que se encuentran en polos opuestos en la respuesta inmune, la primera se caracteriza por un perfil de expresión de citocinas tipo Th2 y la segunda de tipo Th1. Además, se ha propuesto que mucho del componente genético de ambas enfermedades se comparte, pero que este actúa de forma diferente en ambas enfermedades. En este sentido, la sobreexpresión de *TLR7* como resultado de un mayor número de copias, estimula la expresión de citocinas inducibles por el IFN- α y una respuesta autoinmune, mientras que la disminución en la expresión de estas citocinas, favorece una respuesta alérgica. Esta hipótesis explicaría porque para asma el riesgo lo confiere la disminución en el número de copias, mientras que para LES el riesgo está dado por el aumento en las CNVs de este gen.

Así, nuestro estudio aporta evidencia de que la susceptibilidad a desarrollar una entidad autoinmune o alérgica puede estar influenciado por un efecto de dosis

génica. Esta hipótesis es apoyada por Berghofer y cols. (2006) en LES, quienes reportaron que las células de sangre periférica de mujeres sanas producen niveles más elevados de IFN- α que las células de hombres sanos cuando son la estimuladas con agonistas TLR7 (Libert y cols., 2010) y la asociación del bajo número de copias del gen *TLR7* y asma en la población femenina documentada en la presente investigación. Estos hallazgos resultan interesantes ya que se ha propuesto la administración de ligandos de TLR7 como un potencial tratamiento para asma alérgica.

IX. CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que un bajo número de copias en el gen TLR7 podría ser un factor de riesgo para desarrollar asma en población femenina.

El bajo número de copias de TLR7 y su asociación con el género femenino podría aportar evidencias de la participación de la dosis génica ligada al cromosoma X en las enfermedades inmunes.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ait-Khaled N, Enarson DA, Chiang CY, et al. Guía para el manejo del asma. Medidas estandarizadas esenciales. 3ª edición. París, Francia, Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias, 2008.

Alexopoulou L, Czopik A, Medzhitov, et al. Recognition of doublestranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nat* 2001;413:732–738.

Amoudruz P, Holmlund U, Saghafian-Hedengren S, et al. Impaired Toll-like receptor 2 signalling in monocytes from 5-year-old allergic children. *Clin Exp Immunol* 2009, 155: 387–394.

Barton GM y Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nature Rev Immunol* 2009; 9: 535-534.

Bauera S, Hangelb D, Yua P. Immunobiology of toll-like receptors in allergic disease. *Immunobiology* 2007;212: 521–533.

Beckmann JS, Estivill X, Antonarakis SE. Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. *Nature Rev Genet* 2007; 8: 639-646.

Beisswenger C y Bals R. Interaction of allergic airway inflammation and innate immunity: hygiene and beyond. *J Occup Med Toxicol* 2008; 3:S1-S3.

Benedict CA y Ware CF. RIGing a virus trap. *Nat Med* 2005; 11:929-930.

Bercedo Sanz A, Suarez López R, Torregrosa Bertet Ma. Guía de Buena Práctica Clínica en Asma Infantil. Segunda edición, Madrid. Editorial International Marketing y

Communication, 2007; p. 11-24.

Beutler B, Jiang Z, Georgel P, et al. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol* 2006;24:353–389.

Bjørnvold M, Munthe-Kaas MC, Egeland T, et al. A TLR2 polymorphism is associated with type 1 diabetes and allergic asthma. *Genes Immunol* 2009; 10: 181–187.

Böttcher MF, Hmani-Aifa M, Lindström N et al. TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:561-567.

Boyce JA, Broide D, Matsumoto K, et al. Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2008. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:569-74.

Brasch-Andersen C, Christiansen L, Tan Q, et al. Possible gene dosage effect of glutathione-S-transferases on atopic asthma: using real-time PCR for quantification of GSTM1 and GSTT1 gene copy numbers. *Hum Mutat* 2004; 24:208 -14.

Chang ZL. Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflamm Res.* 2010; 59:791–808.

Chisholm D, Libet L, Hayashi T, et al. Airway peptidoglycan and immunostimulatory DNA exposures have divergent effects on the development of airway allergen hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:448–54.

Chun E, Lee SH, Lee SY. et al. Toll-like Receptor Expression on Peripheral Blood Mononuclear Cells in Asthmatics; Implications for Asthma Management. *J Clin Immunol* 2010; 30:459-464.

Crozat K, Beutler B. TLR7: A new sensor of viral infection. *PNAS* 2004; 101:6835–6836.

Denny MF, Thacker S, Mehta H, et al. Interferon-alpha promotes abnormal vasculogenesis in lupus: a potential pathway for premature atherosclerosis. *Blood* 2007;110:2907–2915.

Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004; 303:1529–1531.

Eder W, Klimecki W, Yu L, et al. Association between exposure to farming, allergies and genetic variation in CARD4/NOD1. *Allergy* 2006;61:1117-1124.

Eder W, Klimecki W, Yu L, et al. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:482-488.

Fan YC. Clinical types of childhood asthma and nonatopic asthma. *World J Pediatr*, 2006; 2:172-179.

Gallardo Martínez G, Arias Cruz A, González Díaz SN, et al. Costos derivados de la atención médica del asma en un grupo de niños del Noreste de México. *Rev Alergia Mex* 2007; 54:82-85.

García-Ortiz H, Velázquez-Cruz R, Espinosa-Rosales F, et al. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1861-5.

Gehlhar K, Bilitewski C, Reinitz-Rademacher K, et al. Impaired virus-induced interferon-alpha2 release in adult asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* 2006; 36: 331-337.

Genuneit J, Cantelmo JL, Weinmayr G, et al. 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;39:1875-1888.

GINA: Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2008. www.ginasthma.org.

Goldman M. Toll-like receptor ligands as novel pharmaceuticals for allergic disorders. *Clin Exp Immunol* 2007; 147: 208–216.

Haller G, Torgerson DG, Ober C, et al. Sequencing the IL4 locus in African Americans implicates rare noncoding variants in asthma susceptibility. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1204-1209.

Hawkins GA, Weiss ST, Bleecker ER. Clinical consequences of ADRbeta2 polymorphisms. *Pharmacogenomics* 2008; 9:349-358.

Herrera María José, Gajardo Pilar, Bedoya Juliana, et al. Toll like receptors role in the allergic rinitis. *Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello* 2010; 70: 71-80.

Heil F, Hemmi H, Hochrein, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004;303:1526–1529.

Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature Rev Immunol* 2008; 8:218-230.

Hollingsworth JW, Whitehead GS, Lin KL et al. TLR4 signaling attenuates ongoing allergic inflammation. *J Immunol* 2006; 176:5856–62.

Howard TD, Koppelman GH, Xu J, et al. Gene-gene interaction in asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma. *Am J Hum Genet* 2002; 70:230-236.

<http://www.genecards.org/cgiin/carddisp.pl?gene=TLR7&search=TLR7>.

ISAAC Steering Committee. The International Study of Asthma and Allergies in

Childhood. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms. *Eur Respir J*

1998; 12: 315-35.

Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD. Wheezing Rhinovirus Illnesses in Early Life Predict Asthma Development in High-Risk Children. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178:667-72.

Jain VV, Kitagaki K, Businga T, et al. CpG-oligodeoxynucleotides inhibit airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 867-872.

Jiménez-Morales S. Identificación de SNPs en genes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria asociados a asma infantil. Universidad Autónoma Metropolitana, Méx, D.F., 2009.

Kabesch M, Carr D, Weiland SK, et al. Association between polymorphisms in serine protease inhibitor, kazal type 5 and asthma phenotypes in a large German population sample. *Clin Exp Allergy* 2004;34:340-345.

Kabesch M, Schedel M, Carr D, et al. IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:269-274.

Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:979-87.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like. *Nature immunol* 2010; 11: 373–384.

Kraneveld AD, Hanneke P, Kleij V, et al. Key Role for Mast Cells in Nonatopic Asthma. *J Immunol* 2002;169:2044-2053.

Kormann MS, Depner M, Hartl D, et al. Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 86-92.

Lafferty EI, Qureshi ST, Schnare M. The role of toll-like receptors in acute and chronic lung inflammation. *J Inflamm* 2010; 7:57-63.

Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007;449:564–569.

Li X, Howard TD, Zheng SL, et al. Genome-wide association study of asthma identifies RAD50-IL13 and HLA-DR/DQ regions. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:328-335.

Liu Q, Xia Y, Zhang W, et al. A functional polymorphism in the SPINK5 gene is associated with asthma in a Chinese Han Population. *BMC Med Genet* 2009;10:59-65.

Manian P. Genetics of asthma: A review. *Chest* 1997; 112: 1397-408.

McLean CJ et al. TLR7 and TLR8 Polymorphisms and Acute Asthma in Children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 2009; 179:481-491.

McCartney SA, Colonna M. Viral sensors: diversity in pathogen recognition. *Immunol Rev* 2009; 227:87-94.

March ME, Sleiman PM, Hakonarson H. The genetics of asthma and allergic disorders. *Discov Med* 2011; 11: 35-45.

Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2006;6:823–835.

Martínez Aguilar NE. Etiopatogenia, factores de riesgo y desencadenantes de asma. *Neumol Cir Torax* 2009; 68: S98-S110.

Marenholz I, Nickel R, Rüschemdorf F, et al. Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:866-871.

Masoli M, Fabian D, Holt S, et al. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004; 59: 469-78.

Mogensen TH, Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 240–273.

Moisan J, Camateros P, Thuraisingam T, et al. TLR7 ligand prevents allergen-induced airway hyperresponsiveness and eosinophilia in allergic asthma by a MYD88-dependent and MK2-independent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290:987-995.

Møller-Larsen BS, Nyegaard M, Haagerup A. et al. Association analysis identifies LR7 and TLR8 as novel risk genes in asthma and related disorders. *Thorax* 2008; 63:1064-1069.

Moncayo AL, Vaca M, Oviedo G, et al. Risk factors for atopic and non-atopic asthma in a rural area of Ecuador. *Thorax* 2010; 65:409-416.

Ortega Martell JA, Fernández Vega M. Diagnóstico de asma. *Neumol Cir Torax* 2009; 8: S116-S122.

Palmer CN, Ismail T, Lee SP, et al. Filaggrin null mutations are associated with increased asthma severity in children and young adults. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:64-68.

Pankratz N, Dumitriu A, Hetrick KN, et al. Copy Number Variation in Familial Parkinson Disease. *PLoS One* 2011; 6:124-131.

Parkers LC, Prince LR, Sabroe I. Networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clin Exp Immunol* 2007; 147: 199–207.

Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy. *Thorax* 1999; 54:268-72.

Pereira MU, Sly PD, Pitrez PM, et al. Nonatopic asthma is associated with helminth infections and bronchiolitis in poor children. *Eur Respir J* 2007; 29: 1154–1160.

Pinto LA, Stein RT, Kabesch M. Impact of genetics in childhood asthma. *J Pediatr* 2008; 84: S68-S75.

Pykäläinen M, Kinos R, Valkonen S, et al. Association analysis of common variants of STAT6, GATA3, and STAT4 to asthma and high serum IgE phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:80-87.

Randolph AG, Lange C, Silverman EK, et al. The IL12B gene is associated with asthma. *Am J hum Genet* 2004;75:709-715.

Redecke V, Hacker H, Datta SK et al. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* 2004; 172:2739–43.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444:444–54.

Rifkin IR, Leadbetter EA, Busconi L, et al. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol Rev* 2005;204:27–42.

Romagnani S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 2004; 112:352–363.

Roponen M, Yerkovich ST, Hollams E, et al. Toll-like receptor 7 function is reduced in adolescents with asthma. *Eur Respir J* 2010; 35:64-71.

Sabroe I, Read RC, Whyte MK, et al. Toll-Like Receptors in Health and Disease:

Complex Questions Remain. *J Immunol* 2003; 171:1630-1635.

Schwartz DA. Gene-Environment Interactions and Airway Disease in Children. *Pediatrics* 2009; 123: S151-S159.

Smit LA, Siroux V, Bouzigon E, et al. CD14 and toll-like receptor gene polymorphisms, country living and asthma in adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:363-368.

Stone Aguilar H, García Caballero R, López González AL, et al. Asma infantil: Guías para su Diagnóstico y Tratamiento. *Alerg Asma Inmunol Pediatr* 2005; 14:18-36.

Tantisira K, Klimecki WT, Lazarus R et al. Toll-like receptor 6 gene (TLR6): single-nucleotide polymorphism frequencies and preliminary association with the diagnosis of asthma. *Genes Immunol* 2004; 5: 343–346.

Suttner K, Rosenstiel P, Depner M, et al. TBX21 gene variants increase childhood asthma risk in combination with HLX1 variants. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:1062-1068.

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology* 2005; 17: 1–14.

Takeuchi O, Akira S. Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol Rev* 2007;220:214–224.

Vargas Becerra MH. Epidemiología del asma. *Neumol Cir Torax* 2009; 68:S91-S97.

Lara Pérez EA. Prevalencia del asma infantil al nivel del mar. *Alerg Asma Inmunol Pediatr* 2001; 10:88-92.

Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy *Nature Rev Immunol*. 2008; 8: 169-182.

Wark PA, Johnston SL, Bucchieri F, et al. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rinovirus. *J Exp Med* 2005; 201: 937–947.

Weinmayr G, Weiland SK, Brunekreef B, et al. Atopic Sensitization and the International Variation of Asthma Symptom Prevalence in Children. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:565–574.

Wu H, Romieu I, Shi M, et al. Evaluation of candidate genes in a genome-wide association study of childhood asthma in Mexicans. *J. Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 321-327.

Xirakia C, Koltsida O, Stavropoulos A, et al. Toll-like Receptor 7–triggered Immune

Response in the Lung Mediates Acute and Long-Lasting Suppression of Experimental Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 1207-1216.

Yamamoto M, Takeda K. Current Views of Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Gastroenterol Res Pract.* 2010;10:2-8.

Zhang F, Gu W, Hurles ME, et al. Copy Number Variation in Human Health, Disease and Evolution. *Annu. Rev. Genom. Human Genet* 2009; 10:451-481.

Zhang J, Paré PD, Sandford AJ. Recent advances in asthma genetics. *Respir Res.* 2008; 9:321-328.

Zhang Q, Qian F, Linfu Z, et al. Polymorphisms of TLR7 and TLR8 associated with risk of asthma and asthma-related phenotypes in a southeastern Chinese Han population. *J Nanjing Med Univ* 2009; 23: 25-32.

Zhang Y, Leaves NI, Anderson GG, et al. Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma. *Nat Genet* 2003;34:181-186.

XI. ANEXO

1. Carta de consentimiento informado



Instituto Nacional de
Medicina Genómica
MEXICO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA NIÑOS CON ASMA

México, D. F. a _____ de _____ de 200__

Por medio de la presente hago constar que mi hijo (a) _____, mi cónyuge y yo (y en caso necesario mis otros hijos), estamos de acuerdo en participar en el proyecto de investigación "**Asociación de Polimorfismos en Genes Candidato con la Susceptibilidad, Gravedad y Respuesta al Tratamiento en Población Infantil Mexicana con Asma**"

Estamos enterados de que nuestra participación en el estudio consistirá únicamente en donar una muestra de sangre venosa y responder preguntas relacionadas con la enfermedad de mi hijo(a).

Se nos han explicado que la sangre será tomada de una vena del brazo con todos los requisitos de seguridad, como el uso de material nuevo y por personal calificado, por lo que no representa ningún riesgo para nosotros y que la única molestia que podría presentarse es la aparición de un pequeño hematoma o moretón que desaparecerá en días. Así mismo, nos han comentado que la información obtenida del estudio genético y de los cuestionarios es absolutamente confidencial y que esta información será manejada únicamente por los investigadores y sólo será utilizada para conocer los antecedentes y evolución de la enfermedad.

Estamos conscientes de que nuestra participación en el estudio es completamente voluntaria, que participar no implica pago o retribución alguna y que si en medio del proceso decidimos no continuar, toda la información recopilada será eliminada. Hemos leído la información descrita y nuestras preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente.

Atentamente

Nombre y firma del padre o tutor (No. Telefónico)

Asentimiento del menor

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma del testigo

He entregado al paciente y al padre o tutor del niño la información precisa y necesaria sobre los objetivos del proyecto, riesgos, beneficios y derechos que tienen cada uno de los participantes. Declaro que su decisión de participar en el estudio ha sido tomada de manera libre, sin presiones o influencias de ningún tipo, y soy testigo de que esta carta ha sido firmada por el padre o tutor del niño arriba mencionado.

Nombre y firma del Investigador (No. Telefónico)

2. Hoja de captación de datos



Instituto Nacional de
Medicina Genómica
MEXICO

ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES CANDIDATO CON LA SUSCEPTIBILIDAD, GRAVEDAD Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN POBLACIÓN INFANTIL MEXICANA CON ASMA

1.- Folio

--	--	--	--

FICHA DE IDENTIFICACIÓN

Fecha _____

Institución _____

1. Nombre _____

2. Tipo de asma _____

1 = Leve intermitente 2= Persistente leve
3= Persistente Moderada 4= Persistente grave

3.- Caso índice (0) Familiar (1)

4.- Registro _____

5. Sexo 0=masc, 1=Fem

6.- Edad actual _____ años, meses en decimales (ver claves)

--	--	--	--	--

7. Fecha de nacimiento _____

--	--	--	--	--

8. Dirección actual _____

9. Tel. _____

10.- Lugar de nacimiento del paciente _____

11.- Origen del padre _____

Origen étnico: 12.- Padre _____ 13.- Madre _____

14.- Origen de la madre _____
Origen étnico 15.- Padre _____ 16.- Madre _____

18.- Historia familiar _____

19.- Otros (especifique) _____

20.- Edad de inicio de los síntomas _____

--	--	--	--	--

años, meses en decimales

21.- Edad al diagnóstico _____

--	--	--	--	--

años, meses en decimales

ANTECEDENTES PERSONALES

- 22. Enfermedad atópica _____
- 23. Dermatitis _____
- 24. Rinitis _____
- 25. Asma _____
- 26. Alergia a medicamentos _____
- 27. Alergia a alimentos _____
- 28. Otros _____

ESTADO ACTUAL

- 29. Crisis aguda _____
- 30. Tos _____
- 31. Sibilancias _____
- 32. Disnea _____
- 33. Opresión torácica _____
- 34. Exacerbación por:
 - Polvo _____
 - Animales _____
 - Humedad _____
 - Polen _____
 - Infecciones _____
 - Cambios climáticos _____
 - Estaciones _____
 - Ejercicio _____
- 35. Otros _____

36.- Talla cm 37.- Percentila CDC

38.- Peso kg 39.- Percentila CDC

EXAMENES DE LABORATORIO Y GABINETE

Indicar el valor obtenido:

40. Niveles de IgE (técnica) _____

42. Prueba cutánea (14 alérgenos)
1 positivo _____ 2 negativo

Alérgenos tipos _____

FUNCION PULMONAR

	Función Pulmonar	Lts	% del predicho Polgar
44.-	FVC (pre broncodilatador)		
45.-	FVC (post broncodilatador)		
46.-	FEV1 (pre broncodilatador)		
47.-	FEV1 (post broncodilatador)		
48.-	FEV1/FVC		
49.-	FEF25-75% (pre broncodilatador)		
50.-	FEF25-75% (post broncodilatador)		

EVOLUCIÓN EN EL ULTIMO AÑO

51.- Tratamiento y seguimiento _____

52.- Desde hace _____ meses

53.- No. de crisis agudas _____

54.- N° de hospitalizaciones _____

55.- Manejo servicio de urgencias _____

56.- Crisis en casa _____

57.- N° de visitas de seguimiento _____

0= no, 1= continuo, 2= intermitente

58. Tratamiento en casa _____

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

TRATAMIENTO EN LOS ÚLTIMOS TRES MESES

59.- Tratamiento
 0 = regular 1= irregular

60.- **Medicamento**
 0= Si 1= No
 0= tópico 1= oral

B2-agonistas acción rápida/sem	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Dosis _____
B2-agonistas acción prolongada	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Dosis _____
Esteroides	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Dosis y tipo _____
Antileucotrienos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Dosis _____
Xantinas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Dosis _____
Otros	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Dosis _____

COMPLICACIONES EN EL ÚLTIMO AÑO

61.- Respiratorias _____

0= no, 1= sí, 9= se ignora

62.- Fallecimiento _____

63.- Edad al fallecimiento _____
 años meses en decimales

64.- Causa de muerte _____

HISTORIA FAMILIAR DE ASMA O ALERGIA

64.- Consanguinidad de los padres _____

66.- N° de hermanos afectados _____

67.- N° de hermanos sanos _____

68.- N° tíos paternos sanos _____

69.- N° de tíos paternos afectados _____

70.- N° de tíos maternos sanos _____

71.- N° de tíos maternos afectados _____

72.- N° de primos hermanos afectados (maternos) _____

73.- N° de primos hermanos afectados (paternos) _____

74- Otros familiares afectados _____

Especifique _____

ARBOL GENEALÓGICO

XII. APÉNDICE

Buffer TBE (10X)

Triz-Base 111.6 gramos

Ácido Bórico 82.2 gramos

Na₂ EDTA 9.8 gramos

Aforar a 1 litro con H₂O destilada

Buffer de lisis de glóbulos rojos (RBCL)

Cloruro de Amonio granular (NH₄Cl) 8.3 gramos

Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 0.8 gramos

Sal disódica (Na₂ EDTA) 0.08 gramos

Disolver en 800 ml de H₂O destilada. Filtrar a través de un filtro de 0.2 µm y aforar hasta 1000ml.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 13 de diciembre del 2011, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestro en Ciencias Genómicas, a la QFB. Diana Yuridia López Ley.

Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco

Dr. Mario César López Camarillo

Dr. Máximo Berto Martínez Benítez

Dra. Irma Aguilar Delfín

Coordinación de Certificación y Registro

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada Humano me es ajeno