

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE LA CIUDAD DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS GENOMICAS

IDENTIFICACION DE POLIMORFISMOS EN GENES
INVOLUCRADOS EN LA DIFERENCIACION DE CELULAS TH17
Y SU ASOCIACION CON LA SUSCEPTIBILIDAD A
DESARROLLAR ASMA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENOMICAS

PRESENTA:

QFB. IVAN HUERTA MAGANA

DIRECTORES DE TESIS

DRA. LORENA OROZCO
DRA. SILVIA JIMENEZ MORALES

MEXICO, D. F.

DICIEMBRE DEL 2010

UACM

**Universidad Autónoma
de la Ciudad de México**

Nada humano me es ajeno

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

**IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES
INVOLUCRADOS EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS Th17
Y SU ASOCIACIÓN CON LA SUSCEPTIBILIDAD A
DESARROLLAR ASMA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

P R E S E N T A

QFB. IVÁN HUERTA MAGAÑA

DIRECTORES DE TESIS

**DRA. LORENA OROZCO
DRA. SILVIA JIMÉNEZ MORALES**

ASESORES

**DR. HUMBERTO NICOLINI SÁNCHEZ
DRA. MAVIL LÓPEZ CASAMICHANA
DR. RAFAEL VELÁZQUEZ CRUZ**

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.

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo fué elaborado en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) bajo la dirección de la Dra. Lorena Orozco y de la Dra. Silvia Jiménez M. y por la asesoría del Dr. Humberto Nicolini, la Dra. Mavil López y el Dr. Rafael Velázquez.

Ésta tesis fue subvencionada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con clave de proyecto de salud S0008-2005-14143.

Iván Huerta Magaña agradece al CONACYT por distinguirlo con la beca no. 218956 , con ayuda de la cual, el presente trabajo se concretó.

Iván H agradece personalmente a la *UNAM*, por haberme formado como universitario dentro de sus majestuosas aulas.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lorena Orozco el haberme permitido desarrollar este trabajo de investigación en el laboratorio de enfermedades multifactoriales del INMEGEN. Su apoyo, su paciencia, su valiosa enseñanza, y el haberme brindado su tiempo y su interés en todo momento para mi provecho

A la Dra. Silvia Jiménez el haberme permitido trabajar junto a ella en este proyecto tan interesante. Y también el haber asesorado mi trabajo y haber compartido conmigo sus conocimientos y tantos momentos alegres.

A la Dra. Mavil López el tiempo dedicado a la asesoría y la calidad de su ayuda. También por haber sido una excelente profesora durante la etapa de estudiante y por la muy linda amistad que compartió conmigo.

Al Dr. Humberto Nicolini y al Dr. Rafael Velázquez por la oportuna y valiosa asesoría que me brindaron y por compartir sus conocimientos conmigo.

A la planta de profesores e investigadores del Posgrado en Ciencias Genómicas por haberme dado la oportunidad de haber cursado el programa de maestría dentro de la *H. Universidad Autónoma de la Ciudad de México*, de la cual ha recibido un sin número de satisfacciones profesionales, valiosos y aplicables conocimientos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco mucho la amistad y el cariño que recibí de parte de mis amigos del laboratorio: Yolanda Saldaña, Guadalupe Salas, Julián Ramírez y Emilio Córdova.

Los valiosos consejos e inteligentes recomendaciones que recibí por parte del Dr. Emilio Córdova, el Dr. Federico y la Dra. Irma durante la exposición de los seminarios; de los cuales obtuve una gran enseñanza.

Agradezco la amistad compartida y recibida por parte de todos y cada uno de los estudiantes del laboratorio.

DEDICATORIAS

Con un gran cariño y admiración para mi madre, Edith Magaña; porque tu amor se convierte en mi fuerza en todo momento.

Con Amor e infinito cariño para mi padre, Javier Huerta, porque tus palabras y tu compañía han sido mi motivación.

A J. Omar, porque no me bastarían todas las palabras para decirte cuanto te quiero, hermano mío.

***“Más grande que la conquista sobre mil hombres en una batalla, será la
conquista que se logre sobre uno mismo”***

Buda

ÍNDICE

ABREVIATURAS

ÍNDICE DE FIGURAS y TABLAS

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
I.1 ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA	3
I.1.1 Prevalencia	3
I.1.2 Definición	3
I.1.3 Diagnóstico clínico	4
I.1.4 Clasificación	5
I.1.5 Proceso fisiopatológico del asma	7
I.1.6 Etiopatogénesis del Asma	11
1.6.A Factores genéticos	12
1.6.B Factores intrínsecos	12
1.6.C Factores ambientales	13
I.2 ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO	13
I.2.1 Genética del asma	13
I.2.2 Estrategias para identificación de genes involucrados en asma	14
I.2.2.A Estudios de ligamiento	15
I.2.2.B Estudios de asociación	15
i) Casos y controles	16
ii) Estudios basados en familias (tríos: padres y pacientes)	16
I.2.3 Genes involucrados en asma y fenotipos relacionados	19
2.3.A Los genes de las Citocinas	21
i) El gen de la interleucina IL17F (<i>IL17-F</i>)	22
2.3.B Factores de transcripción	23
i) El gen del factor de transcripción Ets-1 (<i>ETS1</i>)	24
ii) El gen del factor de transcripción FoxP3 (<i>FOXP3</i>)	25
I.3 ESTADO DEL ARTE	26
I.4 IMPORTANCIA DE CONTINUAR CON EL ESTUDIO DEL TEMA	27

II. JUSTIFICACIÓN	29
III. HIPÓTESIS	30
IV. OBJETIVOS	31
IV.1 Objetivo general	31
IV.2 Objetivos particulares	31
V. METODOLOGÍA	32
V.1 Tipo de estudio	32
V.2 Estrategia general	32
V.2.1 Cálculo del tamaño de muestra	33
V.2.2 Población de estudio	33
V.2.3 Extracción de ADN a partir de sangre periférica	34
V.2.4 Cuantificación del ADN	34
V.2.5 Evaluación de la integridad del ADN	35
V.2.6 Diseño de oligonucleótidos y sondas específicas	35
V.2.7 Método fluorescente de 5' exonucleasa (TaqMan)	35
V.2.8 Análisis de resultados e interpretación de datos	37
VI. RESULTADOS	38
VI.1 Población de estudio	38
VI.2 Análisis de genes candidatos	39
VI.2.A Análisis entre casos y controles de SNPs en el gen <i>IL17F</i>	39
VI.2.B Análisis entre casos y controles de SNPs en el gen <i>FOXP3</i>	44
VI.2.C Análisis entre casos y controles de SNPs en el gen <i>ETS-1</i>	48
VII. DISCUSIÓN	52
VIII. CONCLUSIONES	57
IX. REFERENCIAS	58
X. GLOSARIO	65
XI. ANEXO (CAPTACIÓN DE DATOS)	

ABREVIATURAS

aa	aminoácido
ADAM33	Desintegrina y Metaloproteasa con dominio 33
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADRB-2	Receptor Beta 2 adrenérgico
AM	Alelo mayor
Am	Alelo menor
CCL11	Ligando 11 de quimiocinas CC
CCL17	Ligando 17 de quimiocinas CC
CCL22	ligando 22 de quimiocinas CC
CCL24	Ligando 24 de quimiocinas CC
CCR3	Receptor 3 de quimiocinas CC
CCR4	Receptor 4 de quimiocinas CC
Cys-cys	Unión Cisteína-Cisteína
DC	Dicigoto
EBS	Sitio de unión a ETS
ECRHS	Encuesta de Salud Respiratoria de la Comunidad Europea
ETS-1	Oncogén transformante en el virus de la eritroblastosis aviar E ₂₆
FAM	Fluorocromo
FCER1B	Receptor de alta afinidad a inmunoglobulina E
FLG	Filagrina
FOXP3	Fork-head box P3
GATA3	Proteína 3 de unión a secuencias GATA
G-CSF	Factor de crecimiento de colonias de granulocitos
GINA	Iniciativa Global para el Asma
GSDML	Gen tipo Gasdermin
GWAS	Estudio Amplio de Asociación del Genoma
GWS	Escaneo completo del genoma
H	Histidina

HapMap	Mapa Internacional de Haplotipos
HLA	Antígeno leucocitario humano
HW-E	Equilibrio de Hardy-Weinberg
IC	Intervalo de Confianza
IFN-γ	Interferón gamma
IgE	Inmunoglobulina E
<i>IL10</i>	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
<i>IL17-A</i>	Interleucina 17-A
IL-17-F	Interleucina 17- F
IL-4	Inteleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-8	Interleucina 8
IL-9	Interleucina 9
ISAAC	Estudio Internacional de Asma y Alergia en la infancia
Kb	Kilobases
LD	Desequilibrio de Ligamiento
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
MAF	Frecuencia del alelo menor o mutado
MC	Monocigoto
MMP9	Metaloproteinasa 9
MMPs	Metaloproteinasas
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Riesgo Relativo
<i>ORMDL3</i>	<i>Gen tipo oromuscoide</i>
P	Valor de corte de significancia
pb	Pares de Bases
R	Arginina
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RNA	Ácido Ribonucleico
RORγ - t	Receptor de órfanos relacionado al ácido retinoico
SCF	Factor de células madre

SNP	Polimorfismo de un solo Nucleótido
<i>SPINK5</i>	Inhibidor de proteasa epitelial
T CD4+	Linfocitos T no activados que expresan co-receptor CD4
TCR	Receptor de Linfocitos T
<i>TGF-beta 2</i>	Factor de crecimiento transformante beta 2
TGF-beta	Factor de crecimiento transformante-Beta
Th1	Linfocitos T colaboradores tipo 1
Th17	Linfocitos T colaboradores tipo 17
Th2	Linfocitos T colaboradores tipo 2
<i>TLR2</i>	Receptor tipo Toll 2
<i>TLR4</i>	Receptor tipo Toll 4
TNF-alfa	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocitos T reguladores
TSLP	Linfopoiетina tímica del estroma
UV	Ultra Violeta
VIC	Fluorocromo
3'UTR	región 3' no traducible
5'UTR	región 5' no traducible

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Células e intermediarios involucrados en la fisiopatología del asma (pág 8)
- Figura 2. diferenciación de los precursores inactivos T CD4+ (pág 10)
- Figura 3. Estudio de asociación caso-control (pág 17)
- Figura 4. Desequilibrio de transmisión (pág 18)
- Figura 5. Análisis de TaqMan (pág 36)
- Figura 6. Análisis de desequilibrio de ligamiento entre SNPs del gen *IL17-F* (pág 43)
- Figura 7. Análisis de desequilibrio de ligamiento entre SNPs del gen *FOXP3* (pág 46)
- Figura 8. Análisis de desequilibrio de ligamiento entre SNPs del gen *ETS1* (pág 49)

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Clasificación del Asma por gravedad (pág 8)
- Tabla 2. Genes asociados a asma que han sido replicados en 5 estudios independientes (pág 20)
- Tabla 3. Características de los SNPs analizados (pág 32)
- Tabla 4. Distribución de género en la población de estudio (pág 38)
- Tabla 5. Análisis comparativo de la distribución de SNPs entre niños asmáticos y controles en el gen *IL17F* (pág 40)
- Tabla 6. Análisis comparativo de la distribución de SNPs en el gen *IL17-F* en niños asmáticos y controles estratificado por género (pág 41)
- Tabla 7. Análisis comparativo de la distribución del SNP *IL-17F* rs2397084 entre casos con asma infantil y controles (pág 42)
- Tabla 8. Análisis comparativo de la distribución de haplotipos del gen *IL17-F* entre casos con asma infantil y controles (pág 43)
- Tabla 9. Análisis comparativo de la distribución de SNPs en el gen *FOXP3* entre 116 casos con asma infantil y controles femeninos (pág 44)
- Tabla 10. Análisis comparativo de la distribución de SNPs en el gen *FOXP3* entre 151 casos con asma infantil y controles femeninos del SNP rs2232367 (pág 45)
- Tabla 11. Análisis comparativo de la distribución de haplotipos en el gen *FOXP3* entre casos con asma infantil y controles (pág 47)
- Tabla 12. Análisis comparativo de la distribución de SNPs en el gen *ETS1* entre casos con asma infantil y controles (pág 48)
- Tabla 13. Análisis comparativo de la distribución de haplotipos en el gen *ETS1* entre casos con asma infantil y controles (pág 50)
- Tabla 14. Comparación entre la población mexicana y otras poblaciones de las frecuencias del alelo menor de los SNPs analizados (pág 51)

RESUMEN

Introducción. El asma es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta a cerca del 15% de la población infantil mexicana. Hasta la fecha, se ha reportado que polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en más de 120 genes candidato son importantes factores de riesgo para desarrollar la enfermedad y que la presencia y frecuencia de estos pueden variar entre las poblaciones.

Objetivo: Determinar si SNPs localizados en genes involucrados en la respuesta y diferenciación de los linfocitos Th17 se asocian con la susceptibilidad para desarrollar asma en la población pediátrica mexicana.

Material y Métodos. Se incluyó una población de 413 pacientes pediátricos con asma y 424 donadores obtenidos de un banco de sangre como grupo control. A partir de DNA genómico y por medio de la técnica de la 5' exonucleasa (TaqMan), se analizaron 13 SNPs localizados en tres genes candidatos. Para evaluar el poder estadístico del estudio se utilizó el programa QUANTO, las diferencias estadísticas en la distribución de los alelos y genotipos se llevó a cabo con el programa EPIINFO; mientras que el programa FINETTI permitió la evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg y para la construcción de haplotipos se utilizó el programa HAPLOVIEW.

Resultados. Los 13 SNPs estuvieron en HWE. En el análisis del gen *IL17-F* de los tres SNPs incluidos solamente el rs2397084 mostró diferencias significativas (OR 0.407 , IC 95 % [0.183-0.906], $p=0.023$). El análisis de estratificación por género sugiere que esta variante es un factor de riesgo en población femenina (OR 0.215, IC 95 % [0.048-0.963], $p=0.027$). Así mismo los datos derivados del estudio del gen *FOXP3*, mostraron que el SNP rs2232367 mostró diferencias estadísticamente significativas en población femenina (OR 5.351, IC 95% [1.102-25.990], $p=0.035$). No se identificaron SNPs asociados a asma en el gen *ETS1*. **Conclusión.** Nuestros

datos sugieren que el SNP rs2397084 T/C localizado en el gen *IL17-F* es una variante que confiere protección para asma en la población pediátrica mexicana, mientras que el SNP rs2232367 C/T localizado en el gen *FOXP3* es una variante que confiere riesgo en la población femenina analizada.

I. INTRODUCCIÓN

I. 1 ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA

I.1.1 Prevalencia

El asma es una enfermedad compleja con una expresividad muy variable que afecta a niños y adultos. Esta entidad está presente en todos los países. Los estudios internacionales recientes sobre la prevalencia del asma, particularmente el ECRHS (Encuesta de Salud Respiratoria de la Comunidad Europea) y el Estudio Internacional de Asma y Alergia en la infancia (ISAAC, 2007), han mostrado una distribución variable de esta entidad en el mundo (Vargas BM, 2009). Por ejemplo, los países con menor prevalencia de esta enfermedad en niños son: Albania, Austria, Bélgica, Estonia, Alemania, India, Irán y Polonia (1.4-4.2 %) y los de mayor prevalencia son: Australia, Costa Rica y Nueva Zelanda (26.5-27.1 %). La prevalencia del asma en México varía del 6.8-20%, dependiendo de la región geográfica. En el año 2004, en la Ciudad de México, el Instituto Nacional de Pediatría estimó una prevalencia de la enfermedad de alrededor del 15% (Vargas BM, 2009;; Huerta y Penagos J, 2004).

I.1.2 Definición

El asma es un desorden inflamatorio crónico de las vías respiratorias, en cuya fisiopatología existe una gran diversidad de células y componentes celulares implicados. La inflamación crónica está asociada con hiperreactividad bronquial que conduce a episodios recurrentes de broncoespasmo, sibilancias, disnea, acortamiento de la respiración y tos, particularmente por la mañana o la noche (Hanna J, 2008). Estos eventos están generalmente asociados con obstrucción del

flujo de aire dentro de los pulmones que revierte espontáneamente o con tratamiento (Jiménez MS, 2009).

1.1.3 Diagnóstico clínico

Aunque el asma es una de las enfermedades crónicas más comunes de la infancia, no existe un marcador inmunológico, biológico o fisiológico lo suficientemente sensible y específico para establecer su diagnóstico, por lo que éste constituye un reto para los pediatras. Los síntomas en el asma pueden ser intermitentes y se puede confundir con las otras patologías (ie. bronquitis, tuberculosis o fibrosis quística) (Bateman ED, 2008); por lo que su diagnóstico diferencial es esencial para proporcionar un adecuado manejo médico.

Los datos que sustentan el diagnóstico clínico de asma son: el inicio temprano de los síntomas, historia de múltiples episodios de sibilancias, antecedentes de algún familiar con atopia y respuesta clínica a los broncodilatadores o esteroides. Los síntomas se pueden desencadenar por la presencia de un alérgeno, el ejercicio, risa o llanto, medicamentos como la aspirina, etc (Huerta y Penagos, 2004).

Por otro lado la medición de la función pulmonar por espirometría y particularmente la reversibilidad de los síntomas confirman el diagnóstico. La evaluación de la función pulmonar también permite valorar la gravedad de la enfermedad. De hecho la espirometría es el método más confiable para el diagnóstico del asma, en pacientes mayores de 5 años de edad. En ella se mide el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV1), la capacidad vital forzada (FVC) y el flujo espiratorio forzado (PEF). El diagnóstico de asma generalmente se establece cuando la reversibilidad de los síntomas de forma espontánea o después

de un tratamiento con broncodilatadores es mayor o igual al 12 % (*Bateman ED, 2008; Huerta J, 2004*).

1.1.4 Clasificación

A lo largo de muchos años se ha intentado clasificar al asma con base en los factores inductores (infecciones, alérgenos, sustancias ocupacionales, etc.) y con base en la gravedad de la enfermedad.

Etiológicamente, el asma se clasifica en extrínseca e intrínseca. El asma extrínseca, también denominada atópica, es más frecuente en los niños, donde se presenta aproximadamente en el 60% de los casos y se caracteriza por una exagerada respuesta de células T colaboradoras tipo 2 (Th2) y la consecuente presencia de niveles elevados de Inmunoglobulina E (IgE) en suero. El asma intrínseca o no atópica es un síndrome más amplio y no está asociado a la presencia de antígenos; este tipo de asma suele comenzar en la vida adulta y en muchos casos se asocia con pólipos nasales, sinusitis maxilar, ingesta de aspirina, otros anti-inflamatorios no esteroideos y ejercicio. El asma intrínseca puede presentarse con un curso crónico que requiere de esteroides orales para su control (*Bateman ED, 2008; Jiménez MS, 2009*).

En cuanto a la clasificación por gravedad, la Iniciativa Global para el Asma (GINA, por sus siglas en inglés), ha subdividido al asma con base en la frecuencia de los síntomas, el grado de limitación del flujo de aire y la respuesta al tratamiento farmacológico en: intermitente, persistente leve, persistente moderada y persistente grave (Tabla 1). La clasificación del asma por gravedad es útil cuando las decisiones de tratamiento sobre la evaluación inicial de un paciente, deben ser tomadas (*Bateman ED, 2008*).

Tabla 1. Clasificación del asma por gravedad

	Frecuencia de síntomas diurnos	Frecuencia de síntomas nocturnos	Predichos del FEV1	Variabilidad del PEF	Tratamiento
intermitente	< 2 por semana	< 2 por mes	> 80 %	< 20 %	<i>No necesario</i>
Persistente leve	> 2 por semana	2 a 4 por mes	> 80 %	20 a 30 %	Dosis bajas de corticosteroides y mantenimiento con teofilina o modificadores de leucotrienos
Persistente moderada	Diario	> 5 por mes	> 60 % a < 80%	> 30 %	Dosis medias de corticosteroides más dosis medianas de β_2 de acción prolongada
Persistente grave	<i>Continuos</i>	<i>Frecuentes</i>	< 60 %	> 30 %	Altas dosis de glucocorticoides combinados con sustancias relacionadas a teofilina

FEV: volumen espiratorio forzado en 1 segundo

PEF: flujo espiratorio forzado

1.1.5 Proceso fisiopatológico del asma del asma

La evidencia que indica que la inflamación es un componente del asma fue inicialmente observada en autopsias de pacientes con asma fatal. Las vías aéreas mostraron infiltración por neutrófilos, degranulación de células cebadas, engrosamiento de la membrana basal, pérdida de la integridad epitelial y oclusión de la luz bronquial con presencia de moco. En el asma la inflamación de la mucosa bronquial es un fenómeno complejo en el que participan diferentes células de la respuesta inflamatoria, como eosinófilos, linfocitos T, mastocitos, neutrófilos y macrófagos; así como, células epiteliales, fibroblastos y células productoras de moco; además de mediadores como las citocinas y las quimiocinas (Vargas MH, 2009).

La secuencia fisiopatológica del asma puede iniciarse por la activación de los mastocitos que son sensibilizadas después de la interacción entre la IgE y el receptor de alta afinidad para IgE de los mastocitos FcεR1-B, presente en la superficie de estas células con el alérgeno que fue inhalado previamente, de tal forma que ante a este estímulo los mastocitos liberan diversos mediadores broncoconstrictores incluyendo a los cisteinil-leucotrienos y la prostaglandina D₂. En otra secuencia de eventos dentro del mismo proceso, los alérgenos son procesados por las células dendríticas las cuales están condicionadas por las células epiteliales y por los mastocitos para liberar citocinas, que se unen al receptor 4 de quimiocinas (CCR4) para atraer a las células Th2. Estas células son capaces de dirigir la respuesta inflamatoria en las alergias a través de la liberación de IL-4 e IL-13 las cuales estimulan a los linfocitos B para la síntesis de IgE, IL5 e IL9; que están involucradas en la inflamación eosinofílica y la proliferación de mastocitos. Por otro lado, se cree que la hipertrofia y la hiperreactividad de las células musculares lisas

son causadas por mediadores y citocinas derivadas de leucocitos; así mismo los mastocitos, los basófilos y los eosinófilos sintetizan mediadores que causan la constricción del músculo liso de las vías respiratorias (Fig. 1) (Barnes JP, 2008).

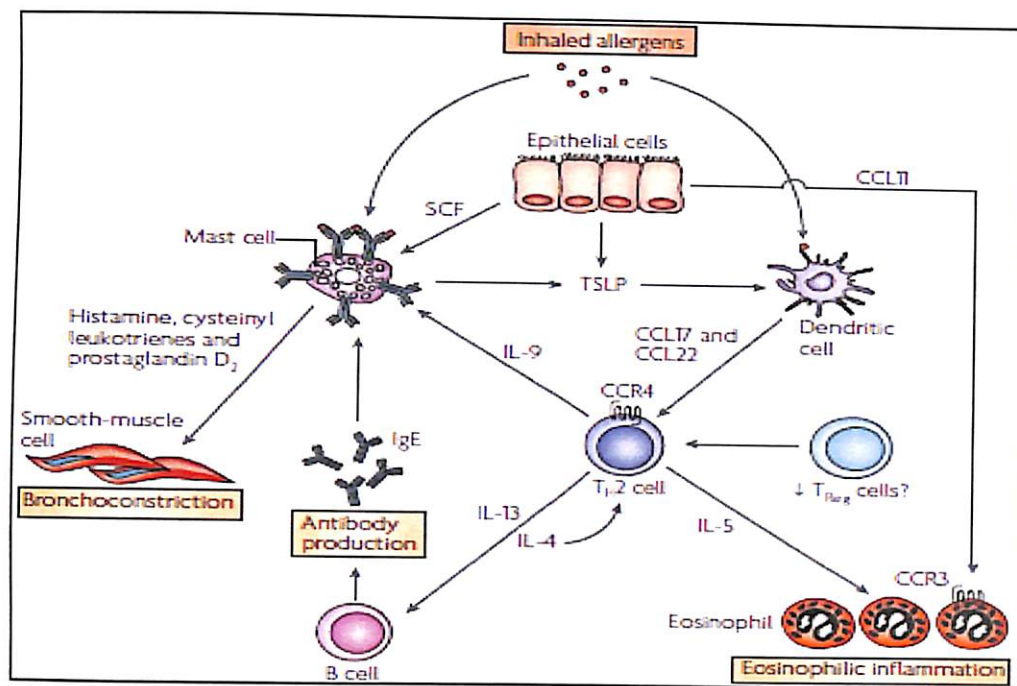


Figura 1. Células e intermediarios involucrados en la fisiopatología del asma. El asma se caracteriza por tener una respuesta de tipo Th2 y la respuesta alérgica inicia cuando un alérgeno activa a las células presentadoras de antígenos los cuales activan a los linfocitos Th0 hacia la expresión de citocinas de respuesta Th2 como IL4 e IL-13. Los linfocitos Th2 a su vez secretan citocinas que activan neutrófilos y eosinófilos que inducen un proceso inflamatorio, producción de IgE, vasodilatación, producción de moco y broncoconstricción. (Tomado de Barnes, J 2008)

Las células T CD4⁺ cooperadoras (Th0) son reguladores esenciales de las respuestas inmunes adaptativas y de las enfermedades inflamatorias. Después de su activación por las células presentadoras de antígenos (APCs), las células T CD4⁺ se pueden diferenciar en células T efectoras, que se consideran especializadas en términos de las citocinas que secretan. Estas células han sido tradicionalmente clasificadas en Th1 y Th2, basado en su perfil de expresión de citocinas y en su función regulatoria en los procesos inmunes. Específicamente, las células Th1 producen IFN- γ para regular la inmunidad celular, mientras que las células Th2 producen IL4, 5 y 13 para mediar la inmunidad humoral y las respuestas alérgicas (Dong C, 2006) .

Acorde con lo anterior, se ha observado que una mayoría de pacientes con asma tiene antecedentes de alergia y atopia y se sabe que las bases inmunológicas de la sensibilización atópica y la enfermedad alérgica se dan como resultado de una respuesta inapropiada de las células Th2. Sin embargo, los avances recientes en la inmunología del asma han evidenciado la participación de otros mecanismos que puedan conducir al desarrollo de la enfermedad, coexistiendo con la inflamación de tipo Th2. Con relación a lo anterior, recientemente se caracterizó un nuevo linaje de células T CD4⁺, en las cuales se demostró que expresaban principalmente al factor de transcripción *ROR γ -t*, producían Interleucina 17 (IL-17) y otras citocinas pro-inflamatorias como IL-21 y 22, que por lo tanto se designaron células Th17 (fig.2) (Romagnani S, 2008, Afzali B y cols, 2007).

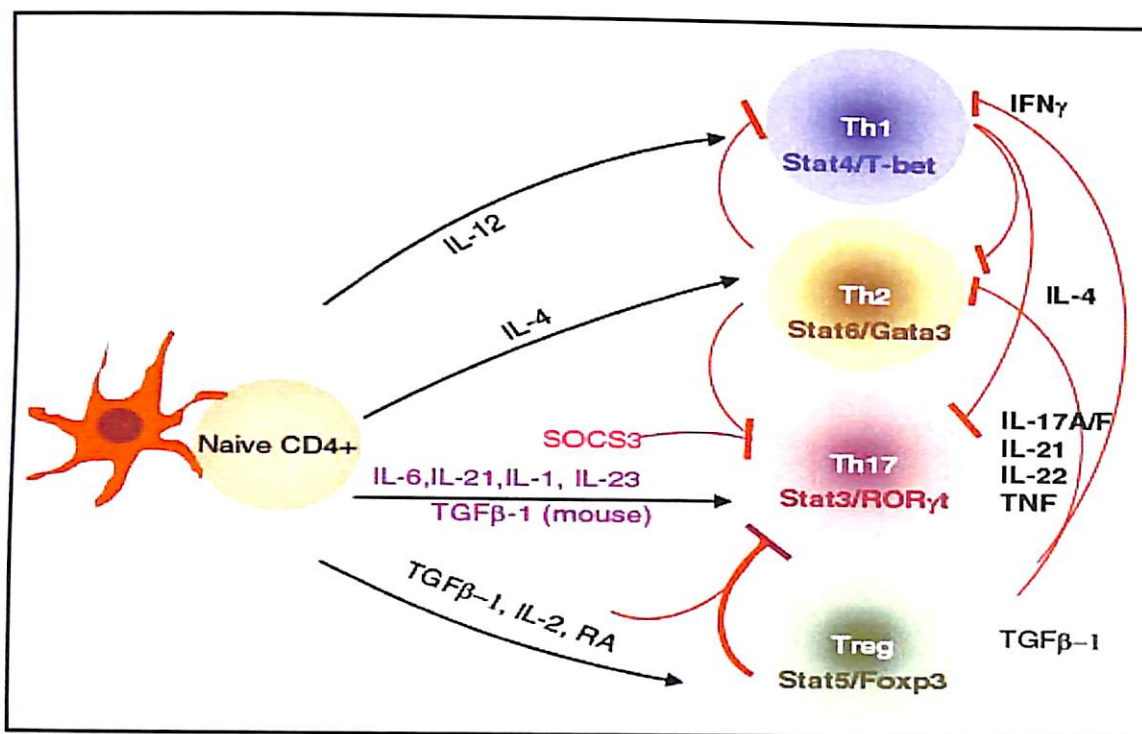


Figura 2. Diferenciación de los precursores inactivos T CD4+. Una vez que las células T CD4+ a través de su receptor (TCR) son activadas y por la señalización correspondiente de interleucinas, se pueden diferenciar hacia 4 linajes celulares llamados células T colaboradoras (Th). Las células T CD4+ cultivadas con TGFβ-1 pueden diferenciarse hacia células T reguladoras Foxp3+ con efectos supresores. En presencia de IL-6, las células T CD4+ pueden diferenciarse en células Th17 productoras de IL-17; la IL-1 puede sinergizar con IL-6 y 23 para inducir la diferenciación y proliferación de las células Th17 (Tomado de Chen Z, 2008).

Los estudios *in vitro* han aportado evidencias de la participación de las células Th17 en la patogénesis del asma; algunos de ellos han demostrado que la IL-17 ejerce una función proinflamatoria a través de la inducción de IL-6, del Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y de prostaglandina E2 (PGE2); además de que puede mediar la quimiotaxis de monocitos y neutrófilos hacia los sitios de inflamación a través de IL-8. También se sabe que IL-17F en acción sinérgica con otras citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) e interferon-gamma (INF-gamma), pueden promover la progresión y amplificación de la inflamación local (Awasthi A y cols, 2009).

1.1.6 Etiopatogénesis en el asma

Los factores que influyen en el riesgo para desarrollar asma pueden ser divididos en aquellos que la causan y en aquellos que inducen las exacerbaciones. Los primeros incluyen a los factores propios del individuo (factores genéticos y los intrínsecos al individuo) y los segundos son los factores ambientales (Bateman ED, 2008; Martínez AN, 2009). La participación de células Th2, Th1 y Th17 en el asma, muestra sólo una de las aristas de la complejidad en la etiopatogénesis de esta entidad, ya que el desarrollo del asma es dependiente de la interacción de todos estos factores.

I.1.6.A Factores genéticos

El asma es una enfermedad compleja, causada por la interacción de múltiples genes (factores genéticos) con el medio ambiente (factores ambientales). Existe la hipótesis de que la participación de estos es inversamente proporcional; es decir, cuando el número de elementos genéticos de riesgo es elevado, se requiere de menos inductores ambientales y entonces la entidad puede presentarse a más temprana edad y la gravedad puede ser mayor; mientras que, en individuos con poca susceptibilidad genética se requiere de una exposición mayor a los inductores ambientales, la enfermedad se presenta más tardíamente y la gravedad es menor (*Jiménez MS, 2009*).

Actualmente existen más de 120 genes reportados y asociados con asma y fenotipos relacionados como la alergia y la hipersensibilidad bronquial (*Palmer LJ y cols, 2001; Pinto LA y cols, 2008*).

I.1.6.B Factores intrínsecos

Los factores intrínsecos del individuo que influyen en la susceptibilidad a desarrollar asma son la edad, el género y la raza. De hecho, en las dos primeras décadas de vida, el asma es más frecuente en hombres que en mujeres (2:1) y la tasa de mortalidad por asma en población adulta es mayor en el género femenino. Por otro lado, los estudios poblacionales acerca de la prevalencia del asma han documentado que ésta es más frecuente en hispanos comparada con la que se describe en las poblaciones negra y caucásica, aunque la gravedad de la enfermedad es mayor en la población negra (*Vargas MH, 2009; Jiménez MS, 2009;*).

I.1.6.C Factores ambientales

Entre los factores ambientales desencadenantes de las manifestaciones clínicas se incluyen : a) la exposición a agentes domésticos (plumas de animales, ácaros, pelo de gato, caspa de animales, moho, etc); b) químicos (tabaco, ozono, dióxido de nitrógeno, azufre, colorantes artificiales, detergentes, etc); c) virales (virus sincitial respiratorio, coronavirus, virus de la influenza y rinovirus); así como, el ejercicio y el estrés emocional (*Bateman ED y cols, 2008; Martínez AN, 2009; Jiménez MS, 2009*).

I.2 ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO

I.2.1 Genética del Asma

La participación de los genes en el desarrollo del asma está bien fundamentada; se ha reconocido que la susceptibilidad para padecer esta enfermedad es de naturaleza hereditaria, con un patrón de herencia complejo.

La evidencia de la contribución genética para asma y sus fenotipos asociados se ha obtenido de los estudios en familias y en gemelos. Muchos estudios en familias han mostrado evidencia de un patrón de agregación familiar sustancial en el asma. Los estudios basados en familias estiman que la agregación familiar de esta enfermedad varía entre el 36-79% y que el riesgo en familiares de primer grado a padecer esta entidad es de 4-5 veces mayor que en la población general (*Neffen H y cols, 2005; Pinto L, 2008*).

Por otro lado, un diseño clásico para estudiar el impacto de la genética en las enfermedades complejas y para distinguir el efecto entre las influencias genéticas en comparación con las ambientales, es el basado en estudios en pares de gemelos. En estos, se comparan las concordancias, entre gemelos monocigóticos y gemelos

dicigóticos. Estos, además, permiten obtener el cálculo de la heredabilidad del asma (h^2), que se define como la proporción de la variación fenotípica que es atribuible a la variación genética de la enfermedad en una población dada. Tal es el caso de un estudio realizado en Australia que incluyó 3,808 pares de gemelos y las concordancias para el asma fueron mayores en gemelos monocigotos (MC) comparados con los dicigotos (DC) (0.48 MC vs 0.09 DC en masculinos y 0.33 MC vs 0.12 DC en femeninos), documentando que una proporción significativa de la varianza de la patogénesis del asma es debida a factores genéticos, la cual tiene una heredabilidad h^2 de 0.60 (*Pinto A y Stein L, 2008*).

En otro estudio publicado en 1997 en población sueca que incluyó a 1,480 pares de gemelos con un rango de edad entre 7-9 años, se reportó una concordancia en gemelos MC de 0.79 en hombres y 0.64 en mujeres; mientras que en gemelos DC ésta fue de 0.25 y un 0.27, respectivamente. La contribución de los factores genéticos para la variación del asma en este estudio fue de alrededor del 0.76 para masculinos y 0.64 para femeninos (*Pinto A, 2008*).

1.2.2 Estrategias para identificación de genes involucrados en asma

La identificación de los genes que influyen en el asma y sus fenotipos asociados se ha llevado a cabo por medio de estudios de ligamiento y de asociación. El análisis de ligamiento y los estudios de asociación son métodos analíticos utilizados para detectar tanto regiones genéticas específicas, como genes que están involucrados en el desarrollo de la enfermedad (*Zhang J y cols, 2008*).

I.2.2.A Estudios de ligamiento genético

Se habla de ligamiento cuando los alelos de dos loci en el mismo cromosoma son transmitidos juntos en la siguiente generación debido a su estrecha proximidad. Estos estudios se realizan en individuos relacionados, ya sea en hermanos (sib pair análisis) o en pedigríes extensos. Los estudios de ligamiento permiten determinar si un marcador genético y el gen que predispone a la enfermedad se encuentran físicamente ligados, mediante el análisis de la co-segregación del marcador con la enfermedad entre los miembros de una familia (Baca y Orozco, 2004).

A diferencia de las enfermedades monogénicas o mendelianas, la aplicación de los análisis de ligamiento en el estudio de las enfermedades complejas como el asma; han tenido poco éxito, debido a la dificultad de encontrar pedigríes extensos, y también a que su etiopatogenia está determinada por la heterogeneidad genética, las interacciones medioambiente-genotipo y los efectos de múltiples loci.

I.2.2.B Estudios de asociación genética

A diferencia de los estudios de ligamiento, donde se analiza la co-segregación de un marcador con la enfermedad entre los miembros de una familia, los estudios de asociación comparan las frecuencias de este marcador entre casos no relacionados y controles e investigan su ocurrencia simultánea con la enfermedad a nivel de la población. Una significativa asociación del marcador con la entidad sugiere un gen candidato en su etiología. Entre las ventajas de los estudios de asociación se encuentran su poder para detectar genes de susceptibilidad aún cuando estos genes tienen una contribución menor en la enfermedad. En los

estudios de asociación existen dos principales tipos de diseño: i) de casos y controles y ii) basados en familias (tríos: padres y pacientes) (Baca y Orozco, 2004)

i) Casos y controles

Estos estudios comparan las frecuencias de una variante alélica o polimorfismo específico entre un grupo de pacientes y una población de controles sanos. La predominancia o disminución del alelo en alguna de las poblaciones de estudio, sugiere que esta variante se encuentra asociada a la enfermedad como factor de susceptibilidad, de protección o como modificador de la gravedad (Fig. 3). Sin embargo, aunque estos estudios han proporcionado gran cantidad de datos, pueden presentar falsas asociaciones como resultado de estratificación de la población o porque el alelo asociado esté en desequilibrio de ligamiento (LD) con el alelo que directamente afecta la expresión del fenotipo. Por lo anterior, los estudios de casos y controles, deben ser validados con estudios basados en familias o ajustados con el uso de marcadores de ancestría (Vercelli D, 2008; Baca y Orozco, 2004).

ii) Estudios de asociación basados en familias (tríos: padres y pacientes)

El diseño de estudio basado en familias (tríos: padres y pacientes) en los cuales se utiliza la prueba de desequilibrio de transmisión (TDT), determina la frecuencia con la que los padres heterocigotos transmiten un marcador específico a sus hijos afectados. Asumiendo que cada marcador tiene la misma probabilidad de transmitirse a la siguiente generación (50%), cuando la transmisión de uno de ellos se observa con una frecuencia mayor a la esperada en el grupo de los casos, se sugiere que éste, puede estar asociado con el riesgo a padecer la enfermedad, y

viceversa, cuando esto ocurre en los controles, entonces se sugiere una asociación del alelo con protección (Fig. 4). Sin embargo, una limitante de esta estrategia es tener el número de tríos suficiente que permita obtener un poder estadístico adecuado (mayor que 80 %) (Baca y Orozco, 2004).

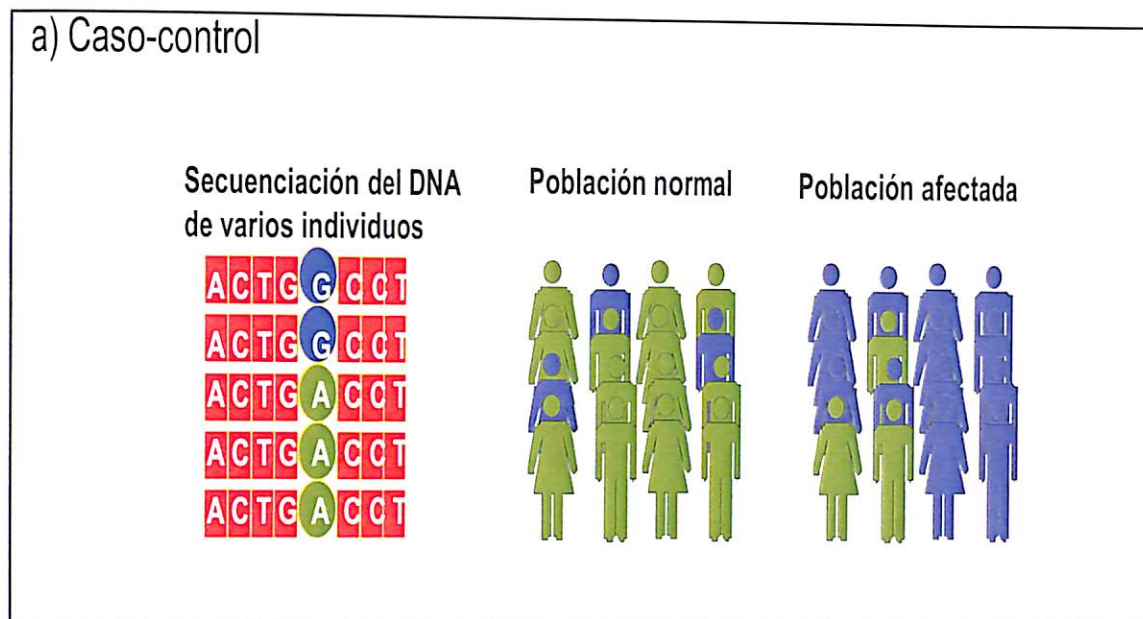


Figura 3. Primero, se genotifica a la población bajo estudio. Posteriormente se comparan las frecuencias de un marcador entre casos no relacionados y controles. La asociación se puede entender como la confirmación estadística que define la coocurrencia de alelos y fenotipos en la población general. Una significativa asociación del marcador con la enfermedad sugiere un gen candidato en la etiología de la misma.

b) Desequilibrio de transmisión

FAMILIA

Padres



Pacientes



Número de Alelos Transmitidos

Alelo G

5

Alelo A

1

Figura 4. La prueba de TDT compara la frecuencia con la cual los padres heterocigotos transmiten un alelo específico de un marcador bialélico o su forma alterna al hijo afectado. Si el marcador alélico se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el locus de la enfermedad o este tiene efecto directo en la misma, se observa una desviación significativa de la frecuencia de transmisión esperada para cualquiera de los 2 alelos (50%).

1.2.3 Genes involucrados en Asma y fenotipos relacionados

Actualmente se han identificado más de 120 genes candidato para asma y sus fenotipos asociados como la hipersensibilidad bronquial y la atopia. Dependiendo de su función estos genes se han podido agrupar en 4 grupos principales: 1) genes de la inmunidad innata e inmunoregulación (*CD14*, *TLR2*, *TLR4* y *TGF-beta*), 2) genes de las funciones efectoras y de diferenciación de las células Th2 (*GATA3*, *FOXP3*, *IL-17*, *IL4*, *IL13*, *FCER1B*, etc), 3) genes asociados a la biología de los epitelios y la inmunidad de las mucosas (*CCL5*, *CCL11*, *CCL24*, *SPINK5* y *FLG*, etc), y 4) genes relacionados con la función pulmonar, vías aéreas, remodelación de tejido y gravedad de la enfermedad (*ADAM33*, *DDP1*, *MMPs*, etc) (Vercelli D, 2008).

Estos genes candidato presentan variaciones o polimorfismos, principalmente de un solo nucleótido (SNPs), que pueden modificar la expresión de los genes o la actividad de la proteína y consecuentemente, influir en el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, estos polimorfismos pueden representar riesgo/protección, modificar la gravedad de la enfermedad o modificar la respuesta al tratamiento. Los polimorfismos de riesgo confieren una predisposición genética para desarrollar asma, a diferencia de los de protección los cuales protegen o limitan el desarrollo de la enfermedad (estos no han sido reportados en asma). La mayoría de los polimorfismos de susceptibilidad se encuentran en genes que codifican para proteínas involucradas en procesos inflamatorios; en la síntesis de IgE y en la respuesta inmune (Tabla 2). Entre los más importantes están las citocinas y sus receptores (Jiménez MS, 2009).

Tabla 2. Ejemplo de Genes asociados a asma que han sido replicados en más de 5 estudios independientes

<i>Gen</i>	<i>Loci</i>	<i>variante</i>	<i>Función</i>
GSTM1	1p13.3	+/- null	Detoxificación de estrés oxidativo y ambiental
FLG	1q21.3	Arg510X, 2282del4	Integridad de la barrera epitelial
IL10	1q31-q32	-1082A/G, -571C/A	Inmunoregulación
CTLA4	2q33	-318C/T, 49 A/G	Inmunoregulación e inhibición de la respuesta linfocitos T
CD14	5q31.1	-1721G/A, -260C/T	Inmunidad innata y respuesta microbiana
IL4	5q31.1	-589C/T, +33C/T	Diferenciación de Th2 e inducción de IgE
SPINK5	5q32	-589C/T, +33C/T	Inhibidor epitelial de proteasas de serina
ADRB2	5q31-q32	Arg16Gly, Gln27Glu	Relajación del músculo liso
HAVCR1	5q33.2	5383_5397del	Regulación de respuesta de linfocitos T, receptor HAV
LTC4S	5q35	-444A/C	Biosíntesis de cisteinil leucotrieno/inflamación
LTA	6p21.3	NcoI (intrón 1)	Inflamación
TNF-alfa	6p21	-308 G/A, -238 G/A	Inflamación
HLA-DRB1	6p21	alelos múltiples de SNP	Presentación de antígenos
HLA-DQB1	6p21	alelos Múltiples de SNP	Presentación de antígenos
HLA-DPB1	6p21	alelos Múltiples de SNP	Presentación de antígenos
GPRA	7p14.3	haplotipos	Regulación de crecimiento celular y mecanismos neurales
FCER1B	11q13	Ile181Leu, Gly237Glu	Receptor de IgE de alta afinidad
CC16	11q12.3	38 A/G	Proteína antiinflamatoria derivada de epitelio
GSTP1	11q13	Ile105Val	Detoxificación de estrés oxidativo y ambiental
IL18	11q22.2	-656T/G, -137G/C	Inducción de INF α y TNF
STAT6	12q13	2964G/A, (GT) _n exón 1	Señalización de IL4 e IL13
NOS1	12q24.2	3391C/T, 5266C/T	Síntesis de óxido nítrico y comunicación celular
CMA1	14q11.2	BstX1, -1903G/A	Serin-proteasa quimotriptica de mastocitos
IL4R	16p12.1-p12.2	Ile50Val, Glu155Arg	Cadena- α de los receptores de IL4 e IL13
CCL11	17q21.1-q21.2	Ala23Thr, -1328G/A	Quimioatrayente de neutrófilos derivado de epitelios
ACE	17q23.3	In/del	Inactivación de mediadores inflamatorios
TGFB1	19q13.1	-509C/T	Inmunoregulación de la proliferación celular
ADAM33	20p13	SNPs múltiples	Interacciones cél-cél y cél-MEC

FLG: filagrina, ACE: Enzima 1 convertidora de angiotensinógeno, HAVCR1: receptor celular 1 del virus de hepatitis C, GPRA: receptor acoplado a proteína G de susceptibilidad a asma (Jiménez M 2009; Vercelli, Nature 2009)

I.2.3.A Los genes de las Citocinas

Las citocinas, son proteínas que actúan como mediadores de señales y están vinculadas en la inducción y control de una multitud de funciones celulares en los sistemas inmune y hematopoyético, entre las que se incluyen, su participación en las reacciones inflamatorias dependientes de IgE. Los genes que codifican para las citocinas, fueron los primeros factores genéticos de riesgo identificados en asma

Las citocinas juegan un papel muy importante en el desarrollo del asma, se sabe que el asma se caracteriza por una respuesta inmune de tipo Th2 principalmente, dentro de la cual está documentado que, las interleucinas 4 y 13, son las principales citocinas que dirigen este tipo de respuesta.

El papel de estas interleucinas en la patogénesis del asma ha sido bien dilucidado. En cuanto a IL4 se sabe que es una citocina clave en el desarrollo de la atopia y que es fundamental en la activación de los linfocitos B para la producción de IgE, la diferenciación de los linfocitos Th0 a Th2, así como la quimiotaxis y la adherencia de eosinófilos. Los estudios de asociación han contribuido y han ampliado el conocimiento sobre la función de esta interleucina. El gen *IL-4* se localiza en la región cromosómica 5q32.1-1.32 y a la fecha se han descrito algunos polimorfismos en su región promotora asociados a niveles elevados de IgE y a asma en algunas poblaciones (*Vercelli D, 2008*). Aunque los resultados son cotroversiales, la variantes -590C/T es el polimorfismo que ha mostrado un mayor nivel de asociación con niveles elevados de IgE en las poblaciones caucásica y japonesa (*Walley y Cookson, 1996; Chiang y cols., 2007*). Por otro lado, se sabe que la IL-13 tiene una participación como mediador de la inflamación alérgica. Experimentalmente se ha observado que induce varios de los síntomas asociados a

asma, ya que, promueve la hiperreactividad inducida por alergenitos, daño de células epiteliales, hiperproducción de moco y eosinofilia. Por su parte, en el gen de *IL13* que se localiza en el cromosoma 5q31 se han descrito 46 SNPs, de los cuales los polimorfismos Gln110Arg (rs20541) y 2044G/A han mostrado asociación con asma y eosinofilia, mientras que el SNP C-1112T(rs1800925) contribuye con hiperreactividad bronquial (HRB) y asma. (Heizmann y cols 2000, He y cols, 2003).

i) El gen de la interleucina 17- F (*IL-17F*)

El gen que codifica para *IL17F* pertenece a una familia de 6 genes de *IL17*: (*IL17A-IL17F*) que se nombraron de acuerdo al orden en que se encontraron. Estructuralmente el gen *IL17F* tiene una longitud de 7,742 pb, contiene 3 exones, codifica para una proteína de 153 aminoácidos y comparte un 40% de homología con la *IL17-A* (Kawaguchi M, 2006).

En este gen se han descrito cerca de 120 SNPs; sin embargo, los estudios de asociación han mostrado que sólo el rs763780 está involucrado en la etiología del asma. Este SNP conduce al cambio de una histidina por una arginina en el aminoácido 161 (H161R) de la proteína. Kawaguchi y cols. (2005) probaron el efecto funcional de este SNP y encontraron que el genotipo mutante de *IL17-F* no fue capaz de inducir la vía de señalización que involucra RAF1, MAPK1/2 y MAPK1/3, ni tampoco de inducir la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias como CSF2, IL-8, CXCL1 y CXCL5 en una línea celular humana de epitelio bronquial.

Un estudio genético que sugirió asociación fue el descrito por Kawaguchi y cols. en el año 2006, en el cual se incluyó una población japonesa de 432 pacientes y 435 controles, y se encontró que en estado homocigoto (161R), el polimorfismo confería protección para asma en la población estudiada. Estos resultados fueron

controversiales con aquellos reportados previamente por Ramsey y cols. (2005) donde genotipificaron 5 SNPs en este gen en 1,027 pacientes femeninos norteamericanos y no encontraron asociación entre estos SNPs o sus haplotipos con asma, incluyendo la variante H161R. sin embargo, esto podría ser explicado por desequilibrio de ligamiento con la verdadera variante, diferencias en los factores ambientales entre poblaciones o por genes modificadores involucrados que puedan influir en la asociación. Como sea, estos resultados podrían ser objeto de replicación en otras poblaciones; ya que, la evidencia disponible en relación a las funciones de la IL17-F, y en particular de este polimorfismo, sugieren que este gen es un importante candidato para los estudios de susceptibilidad en asma.

I.2.3.B Factores de transcripción

Dentro de los mecanismos de inmunoregulación en la función de las células *Th17*, se ha reportado que los factores de transcripción Ets-1 y FoxP3 tienen un papel crucial en la regulación de estas células, ya sea a través de la interacción directa entre estos factores con los factores de transcripción propios de los linfocitos *Th17* o de la disminución de la expresión de otras interleucinas pro-inflamatorias involucradas en la diferenciación de este linaje celular, como la IL-2 (*Chen Z y O' Shea J*, 2007; *Miossec P y cols.*, 2010; *Moissan J y cols*, 2007).

i) El gen del factor de transcripción *Ets-1* (*ETS1*)

Las proteínas Ets comprenden una familia de factores de transcripción que comparten un dominio único de unión a DNA (*Dittmer J, 2003*). *Ets* fue identificado originalmente como un oncogen transformante del virus de la eritroblastosis aviar E26 y se ha encontrado involucrado en la invasión y metástasis en tumores malignos del humano. Los factores de transcripción Ets se unen al DNA por medio de una región carboxilo terminal de 80 aa a una secuencia consenso (GGGAAT) llamada EBS, del inglés (ETS Binding Site). Estas regiones están presentes en los promotores de genes involucrados en la proliferación celular, diferenciación, desarrollo, hematopoyesis, apoptosis, remodelación de tejidos y angiogénesis (*Mc Kinlay, 1998*).

Se ha sido reportado que la deficiencia de *Ets-1* está asociada con un incremento en la proliferación de células *Th17*, en la producción de *IL-17 in vivo* e *in vitro* y con la sobreexpresión del RNA mensajero para *IL-22* e *IL-23* en respuesta a *IL-6* y *TGF-beta* (*Chen Z 2007; Mc Kinlay 1998*). Por otra parte, Moisan y cols. en el año 2007 reportaron niveles elevados de *IL-17* en células T knock out (KO) para *ETS1*, y en tejido pulmonar de modelos murinos KO *Ets1*⁻, en los cuales además, se observó sobreproducción de moco en vías aéreas. Nakamura y cols en el año 2004, demostraron, en ensayos *in vitro*, que la expresión del factor de transcripción *Ets-1* estaba incrementada en la vía aérea de pacientes asmáticos cuando se llevó a cabo una comparación con los individuos sanos. Estos mismos autores también demostraron que en fibroblastos derivados de la mucosa de las vías aéreas de estos pacientes existía relación entre la expresión de *Ets-1* y la expresión de Tenascina y Metaloproteinasa 9 (MMP9), en un mecanismo dependiente de TNF-alfa.

Interesantemente, tanto la Tenascina como MMP9 son enzimas involucradas en la remodelación de las vías aéreas de pacientes con asma. Por otro lado, previo a la realización de esta tesis, en nuestro laboratorio el grupo de investigación en enfermedades inmunes del INMEGEN realizó un estudio amplio del genoma comparando niños asmáticos y controles sanos, donde se encontraron evidencias de asociación estadísticamente significativas con los SNPs rs4497423, 1940745 y 12795392, lo que sugirió la participación de *ETS1* en asma (comunicación personal).

ii) El gen del factor de transcripción FoxP3 (*FOXP3*)

Foxp3 del inglés (forkhead box P3) es un factor de transcripción codificado por el gen *FOXP3* localizado en la región p11.23 del cromosoma X, contiene 12 exones y codifica para una proteína de 13.8 kDa. FoxP3 se expresa en una subpoblación distinta de células T inmunosupresoras que pueden desarrollarse en el timo (nTregs) o ser inducidas en la periferia (iTregs). Existen evidencias que muestran que la proliferación de las células Th17 es regulada indirectamente por la función de las células T reguladoras (Tregs). Se sabe que la subpoblación de Tregs es esencial para la preservación de la tolerancia periférica y que a través de la estimulación del receptor de células T (TCR) y de TGF β -1, las células T CD4⁺ inactivas (*Th0*) se pueden transformar en células con efectos supresores (Robinson DS, 2009).

En las células T CD4⁺ vírgenes, TGF β -1 induce la expresión de los factores de transcripción ROR γ -t en las células Th17 y Foxp3 en las células Treg. A pesar de la inducción de ROR γ -t, TGF-beta no es capaz de inducir la diferenciación de las células Th17 *in vitro*, a menos que citocinas pro-inflamatorias como IL-6 o la IL-21 estén presentes (Ivaylo I y cols, 2007).

Se ha encontrado que solamente la isoforma completa de Foxp3 interacciona con ROR γ -t e inhibe su función, lo que sugiere que Foxp3 inhibe la expresión de *IL-17* dirigida por ROR γ -t. Además, también se ha descrito que las mutaciones que eliminan la unión de Foxp3 al DNA, disminuyen su habilidad de inhibir la expresión de *IL-17*, sugiriendo que Foxp3 inhibe la expresión de los genes blancos de ROR γ - t por medio de unión directa al factor de transcripción ROR γ -t (*Ichiyama K y cols, 2008*). La disminución de la función inhibitoria de *Foxp3* y la regulación negativa de su expresión, contribuyen al surgimiento de células *Th17* en un ambiente de señalización de interleucinas en el que esté disponible la interleucina proinflamatoria *IL-6* (*Chen Z, 2004; Robinson DS, 2009; Ivaylo I, 2007*).

I.3 ESTADO DEL ARTE

En el año 2007 ocurrió un gran salto en los análisis de asociación de fenotipo y genotipo, con la publicación del primer estudio amplio de asociación del genoma GWAS (por sus siglas en inglés). Los estudios de asociación amplia del genoma, que actualmente están en marcha, han emergido como un nuevo enfoque poderoso para identificar nuevos genes candidatos en las enfermedades complejas comunes. Además, estos son de gran utilidad para identificar múltiples variantes genéticas asociadas con las enfermedades complejas, como el asma y sus fenotipos asociados (*Zhan J, 2008; Pinto LA, 2008*).

Los estudios amplios de asociación del genoma se basan en el análisis de un gran número de SNPs distribuidos a lo largo de todo el genoma, para buscar aquellas variantes que tengan un significado importante en la enfermedad compleja. El advenimiento de los GWAS han sido fomentados por algunos avances recientes;

entre los cuales se incluyen: a) el recurso del Mapa Internacional de Haplotipos (HapMap), el cual proporciona información de los patrones de variación amplia del genoma y de desequilibrio de ligamiento en cuatro muestras poblacionales que facilita de manera importante el diseño y análisis de los estudios de asociación y b) la disponibilidad de microarreglos de alta densidad que contienen más de un millón de SNPs que proporcionan una cobertura de la mayoría del genoma humano (Vercelli D, 2008; Zhang J, 2008). En el primer estudio de asociación amplia del genoma en asma que se realizó en población infantil europea, se analizaron 307,328 SNPs y se reportó una asociación significativa con SNPs localizados en los genes *ORM1-like*, *ORMDL3* y *GSDMB*. Posteriormente, estos resultados fueron replicados en estudios subsecuentes incluyendo a la población mexicana (Wu H y cols, 2009).

Este abordaje también ha mostrado que la región 9q21.31 es un locus de susceptibilidad para asma en población pediátrica mexicana. En este análisis donde se incluyeron 492 tríos se identificó que el SNP rs2378383 localizado río arriba del enhancer LTE4 es un nuevo locus de susceptibilidad para desarrollar asma en la población infantil mexicana (Wu H y cols, 2010).

1.4 IMPORTANCIA DE CONTINUAR CON EL ESTUDIO DEL TEMA

Las dificultades inherentes al diagnóstico, así como el impacto económico real que tiene el tratamiento de los pacientes asmáticos, se deben principalmente a que el asma puede ser confundida con otras enfermedades respiratorias. Por lo anterior es urgente encontrar estrategias que permitan establecer el diagnóstico preciso y las estrategias de tratamiento adecuadas para disminuir no sólo el impacto económico, sino también el impacto social de esta entidad en nuestro país.

Existen fuertes evidencias que indican que la susceptibilidad a desarrollar asma es debido a factores genéticos, por lo tanto la identificación de estos factores, sin duda

es una excelente alternativa para entender mejor la patogénesis del asma y puede conducir a mejorar las estrategias de diagnóstico y tratamiento.

Conocer el defecto básico de la enfermedad e identificar los principales factores genéticos relacionados con su etiopatogenia, contribuirá a su entendimiento y se podrán sentar las bases para estudios funcionales y farmacológicos que permitan dilucidar los mecanismos bioquímicos y moleculares del asma. En un futuro, el conocimiento generado de los estudios genómicos podrán ser aplicados al diseño de estrategias encaminadas a mejorar los métodos de diagnóstico y con certeza, el desarrollo de tratamientos más individualizados.

II. JUSTIFICACIÓN

El asma es la enfermedad crónica más común en la infancia y en México es una de las principales causas de hospitalización de niños, lo que aunado al alto costo de su tratamiento, hacen de ella un problema de salud pública. Se sabe que el asma tiene un gran componente genético y que es una enfermedad compleja en la cual, tanto los factores genéticos como los ambientales en conjunto, juegan un papel relevante en su desarrollo.

Hasta la fecha se han reportado SNPs en más de 120 genes candidatos que confieren riesgo para asma o modifican su gravedad y la respuesta al tratamiento. Múltiples análisis genéticos han revelado que las diferencias en la contribución e importancia de los SNP involucrados en el asma, entre los diferentes grupos étnicos podrían explicar la heterogeneidad poblacional en el riesgo a padecerla, por lo que resulta importante identificar a las variantes de riesgo o protección en cada población.

El descubrimiento de nuevos factores genéticos asociados y aquellos que son propios de nuestra población, podrá sentar las bases para futuros estudios que permitan explicar más detalladamente los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis del asma.

III. HIPÓTESIS

Variantes alélicas en genes implicados en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células Th17, pueden conferir riesgo o protección para el desarrollo de asma en la población infantil mexicana.

IV. OBJETIVOS

IV.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si variantes alélicas en genes involucrados en la diferenciación y proliferación de las células Th17 tienen una contribución en la etiopatogénesis del asma.

IV.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Determinar si los SNPs localizados en los genes *ETS1*, *IL17F* y *FOXP3* se asocian con la susceptibilidad o protección para desarrollar asma en población infantil mexicana.
- b) Determinar si existen haplotipos de riesgo o de protección para desarrollar asma.
- c) Conocer las frecuencias de las variantes analizadas en la población mexicana y compararlas con las reportadas en otras poblaciones.

V. METODOLOGÍA

V.1 TIPO DE ESTUDIO

Se presenta un estudio de casos y controles, transversal, descriptivo y comparativo.

V.2 ESTRATEGIA GENERAL

En este estudio se incluyeron un grupo de 320 niños con diagnóstico clínico de asma y 424 controles sin antecedentes de asma y fenotipos relacionados. A cada individuo se le tomó una muestra de sangre venosa periférica, de la cual se realizó la extracción de DNA genómico. Posteriormente, se evaluó la concentración e integridad de cada muestra. El análisis de discriminación alélica se realizó mediante la técnica de fluorescencia de la 5' exonucleasa (TaqMan), incluyendo 13 SNPs distribuidos en los genes: *IL17-F*, *ETS1* y *FOXP3* (Tabla 3).

Tabla 3. Características de los SNPs analizados

Gen	SNP	Función/localización	AM/Am
<i>IL17-F</i>	rs2397084	Exón 3 / E126G	T/C
	rs763780	Exón 3 / H161R	T/C
	rs1953325	3' UTR	T/G
<i>ETS-1</i>	rs1940745	Región intergénica 5'	A/C
	rs1128334	3' UTR	C/T
	rs4937333	3' UTR	C/T
	rs4497423	Región intergénica 5'	T/C
	rs1275392	Región intergénica 5'	A/G
<i>FOXP3</i>	rs2280883	Intrón 10	T/C
	rs2232367	Exón 8 / S181S	C/T
	rs3761549	Intrón 1	G/A
	rs2232365	Intrón 1	C/T
	rs2294021	Intrón 1	T/C

AM: alelo mayor, Am: alelo menor, rs: id. Base de datos NCBI, E: ácido glutámico, G: glicina, H: histidina, R: arginina, S: serina, 3' UTR: región 3' no traducible, 5' UTR: región 5' no traducible.

V.2.1 Cálculo del tamaño de muestra poblacional

El cálculo de la muestra se realizó con el algoritmo del programa QUANTO (<http://hydra.usc.edu/GxE>), asumiendo un modelo de riesgo aditivo y tomando en consideración lo siguiente: a) diseño del estudio (casos y controles), b) valores reportados de las frecuencias alélicas de los SNPs (0.01-0.3), c) prevalencia de la enfermedad en la población (10%), d) poder estadístico mínimo del 80 %, e) significancia estadística de 0.05; f) un rango de valores de riesgo relativo o razón de momios (OR) de 1.3-3.0 y g) un límite de confianza del 95 % ($1-\alpha=95\%$).

V.2.2 Población de estudio

En este estudio se incluyeron 320 pacientes no relacionados de 5 a 17 años de edad, con diagnóstico clínico y funcional de asma (espirometría); que fueron reclutados de 4 instituciones de salud de tercer nivel de la Cd. de México (Hospitales Regionales 1º de Octubre y Adolfo López Mateos del ISSSTE, Hospital Infantil de México e Instituto Nacional de Pediatría). Cada paciente fue evaluado por un médico Neumólogo o Alergólogo. Como controles se incluyeron 424 individuos sanos no relacionados, sin antecedentes personales de asma o atopía. Los controles fueron reclutados del banco de sangre del Instituto Nacional de Pediatría y del Hospital Infantil de México. Dado que el genotipo no cambia con la edad y que no existen evidencias de que los SNPs seleccionados influyan en la sobrevivencia, se capturaron controles mayores de 18 años para disminuir la probabilidad de seleccionar individuos con susceptibilidad a padecer asma u otra enfermedad atópica. Todos los pacientes y controles nacieron en la República Mexicana, al igual que sus padres

abuelos y bisabuelos (mexicanos-mestizos) y ambas subpoblaciones se parearon por origen étnico y por género.

Para incrementar el poder estadístico del estudio se incluyeron 93 casos más, llevando el tamaño de muestra de 320 a 413, los cuales fueron analizados únicamente para los SNPs que mostraron asociación.

V.2.3 Extracción de DNA a partir de sangre periférica

Para la extracción de DNA, se utilizaron alternativamente dos Kits, QIAgen Blood (QIAGEN) y PUREGENE (GENTRA), bajo las especificaciones establecidas por los proveedores. Se adicionaron 3 ml de solución de lisis celular al tubo que contiene el botón de células blancas; se agitó vigorosamente en el vortex durante 1 min hasta eliminar los agregados celulares. Posteriormente, a este mismo tubo se le agregó 1 ml de solución para precipitar proteínas, se agitó vigorosamente en un vortex durante 1 min y luego se centrifugó la muestra a 3,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante fue transferido cuidadosamente a un tubo limpio, al cual se le agregó 5 ml de isopropanol para precipitar el DNA. Las hebras de DNA fueron evidentes después de que el tubo se había agitado por inversión por lo menos 6 veces. Finalmente, con una pipeta Pasteur se extrajo el DNA y se resuspendió en 500 µl de buffer TE (TEKNOVA).

V.2.4 Cuantificación del DNA

La cuantificación del DNA se llevó a cabo en un Nanodrop. El sistema arroja la concentración en ng/µl. Los índices de pureza y de proteínas se determinaron automáticamente en este sistema. Un valor mayor a 1.6 indicó un nivel de pureza del DNA adecuado para realizar análisis posteriores.

V.2.5 Evaluación de la integridad del DNA

La evaluación de la integridad del DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio. En el gel se cargó 1 μ l de DNA con 5 μ l de azul de bromofenol. La electroforesis se corrió a 100 volts durante 30 minutos y finalmente se observó en un transiluminador con luz UV. La integridad del DNA se consideró adecuada cuando su peso molecular fue mayor a 23,000 (pb).

V.2.6 Diseño de oligonucleótidos y sondas específicas

Las sondas de oligonucleótidos para analizar cada uno de los SNPs fueron diseñadas obteniendo la secuencia de cada gen en la base de datos del "Gene Bank" (NCBI) y utilizando los programas Primer Express 3.0 y File Builder v3.0 (Applied Biosystem Foster City, CA, USA).

V.2.7 Método fluorescente de la 5' exonucleasa

Para cada ensayo de discriminación alélica se diseñaron 2 sondas específicas marcadas en el extremo 5' con fluorocromos diferentes, VIC para el alelo 1 y FAM para el alelo 2. Además ambas sondas contienen en el extremo 3' un "quencher" (TAMRA) el cual mientras la sonda permanece intacta, inhibe la emisión de fluorescencia. Durante la Reacción de en Cadena de la Polimerasa (PCR) los primers hibridan con una secuencia específica del templado de DNA. Si éste contiene la secuencia polimórfica, la sonda TaqMan también hibrida con su secuencia homóloga. Durante la amplificación la *AmpliTaq Gold*, que tiene actividad tanto de DNA polimerasa como de exonucleasa 5'-3', es capaz de digerir la sonda que hibrida y liberar la señal fluorescente de la acción del "quencher". De tal manera

que, sólo la sonda específica para el polimorfismo presente es capaz de hibridar. De esta forma es posible diferenciar un alelo del otro con base en el tipo de fluorescencia emitida (fig. 5).

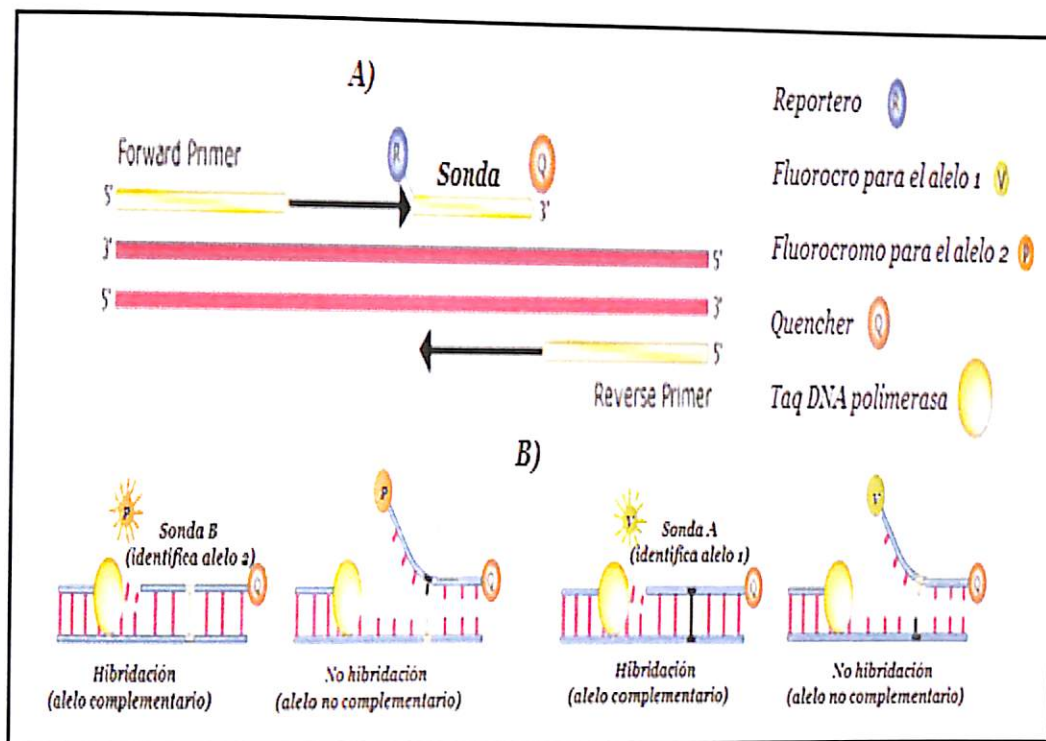


Figura 5. Análisis de TaqMan. La polimerasa digiere la sonda que es complementaria al ADN blanco, de esta forma el fluorocromo (VIC/FAM) que la identifica emite fluorescencia, la cual es detectada en un sistema automatizado. Por las diferencias en la longitud de onda emitidas entre los 2 fluorocromos se puede conocer el genotipo de cada individuo.

V.2.8 Análisis de resultados e interpretación de datos

La asignación alélica tanto de casos y controles se realizó utilizando el programa SDS, implementado en el sistema de PCR en tiempo real 7900 HT fase (Applied Biosystems Foster city, CA, USA).

Se determinó la significancia estadística de las diferencias observadas entre casos y controles en la distribución de genotipos y alelos por medio del programa Epi Info (v. 6.02) (CDC Atlanta USA), donde los valores de $p < 0.05$ se consideraron como significativos. La evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se realizó mediante el programa FINETTI y la construcción de haplotipos se llevó a cabo con el programa HAPLOVIEW (v. 3.32).

VI. RESULTADOS

VI.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

En el estudio, se incluyó una población de 724 individuos no relacionados; de los cuales 320 fueron niños con diagnóstico de asma de 5-17 años de edad y 424 adultos sanos como controles. De los casos, 126 fueron femeninos (40%) y 193 (60%) masculinos, mientras que la población control estuvo conformada por 174 (41%) femeninos y 250 (59%) masculinos (Tabla 4).

Para incrementar el poder estadístico del estudio se analizaron 93 casos más incrementando el tamaño de muestra de 320 a 413, únicamente para los SNPs que mostraron asociación en el análisis previo. Con la muestra de 413 pacientes la distribución de géneros fue 39% femeninos y 61% masculinos.

Tabla 4. Distribución de género en la población de estudio

GÉNERO	CASOS (%)	CONTROLES (%)
Femeninos	126 (40)*	174 (41)
Masculinos	193 (60)**	250 (59)
Total de individuos	320	424

Población adicional: * 35 femeninos, ** 58 masculinos

VI.2 ANÁLISIS DE GENES CANDIDATOS

En este estudio se incluyeron 13 SNPs distribuidos en los genes candidato: *IL-17F* (3), *FOXP3* (5) y *ETS1* (5). La distribución genotípica y alélica tanto en controles como en casos de todas las variantes analizadas, se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. Esto es relevante porque las desviaciones en el HWE pueden deberse a resultados de errores de genotipificación; ya que la composición genética de la población se mantiene en equilibrio mientras no existan factores como la selección natural, endogamia o nuevas mutaciones.

VI.2.1 Análisis entre casos y controles de SNPs en el gen *IL17-F*

Se analizaron cuatro polimorfismos del gen *IL17-F*: rs2397084 (T/C), rs763780 (T/C), rs1953325 (T/G) y el rs11465553 (C/T). El polimorfismo rs11465553 no fue informativo en la población de estudio, resultado que coincide con lo reportado para otras poblaciones como la europea, la asiática, la africana y la afroamericana. De los tres SNPs presentes en la población mexicana, sólo el (rs2397084 T/C) mostró diferencias estadísticamente significativas en la distribución del alelo menor (C) entre casos y controles. El alelo C que codifica para una glicina se observó con mayor frecuencia en el grupo de controles (3.1%) comparado con el grupo de casos (1.29 %), sugiriendo un OR de protección (OR = 0.407, p=0.023). El análisis de los polimorfismos rs763780 y rs1953325 no mostró diferencias significativas en su distribución entre controles y casos (4.5 vs 4.5 %, p = 0.994 y 1.4 % vs 1.0, p= 0.486, respectivamente) (Tabla 5).

Posteriormente, se llevó a cabo el análisis comparativo entre casos y controles estratificando por género. De manera interesante, se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.027$) en la distribución del alelo C del polimorfismo rs2397084 entre casos y controles femeninos. Este alelo se encontró en el 0.83 % de casos mientras que en controles en el 3.75%. Dado que en la población masculina no se encontró diferencias estadísticamente significativas, se sugiere que las diferencias detectadas cuando se compararon casos y controles de la población total es dada por la asociación conferida por el género femenino (Tabla 6).

Tabla 5. Análisis comparativo de la distribución de SNPs en el gen *IL-17F* en niños asmáticos y controles

SNP	%		OR [95% IC]	P
	Controles (424)	Casos (320)		
rs2397084 (T/C)	3.1	1.29	0.407 [0.183-0.906]	0.023
rs763780 (T/C)	4.5	4.5	1.000 [0.607-1.648]	0.994
rs1953325 (T/G)	1.4	1.0	1.389 [0.548-3.521]	0.486

OR: Odds Ratio, P = significancia estadística 0.05, IC: Intervalo de Confianza

Tabla 6. Análisis comparativo de la distribución de SNPs en el gen *IL-17F* en niños asmáticos y controles estratificando por género

SNP	% Masculinos		OR [IC 95 %]	P	% Femeninos		OR [95 %IC]	P
	Casos	Cont			Casos	Con		
rs2397084 (T/C)	1.6	2.6	0.596 [0.224-1.582]	0.2936	0.833	3.75	0.215 [0.048-0.963]	0.027
rs763780 (T/C)	5.0	4.0	1.051 [0.567-1.949]	0.8742	3.3	4.0	0.818 [0.391-1.981]	0.655
rs1953325 (T/G)	2.4	1.8	1.347 [0.529-3.427]	0.5303	3.6	2.4	1.465 [0.573-3.743]	0.422

OR: Odds ratio, P= significancia estadística 0.05, IC: intervalo de confianza

Para incrementar el poder estadístico del estudio se analizó el SNP rs2397084 (T/C) en 93 pacientes más haciendo el análisis con un total de 413 casos y los resultados fueron reproducibles, el alelo C fue más frecuente en los controles que en casos (3.1 vs 1.1%, respectivamente) y la significancia estadística se mantuvo (OR = 0.352, 95% IC: 0.164-0.755, p = 0.00518) (Tabla 7). Así mismo, también este comportamiento también se observó cuando se estratificó por género (3.75% en controles femeninos vs 0.74 % en casos femeninos, OR = 0.165, 95% IC: 0.037-0.738, p= 0.00749).

El análisis de genotipos de riesgo mostró resultados similares a los encontrados para el alelo C (OR 0.344, 95% IC: 0.159-0.744, p=0.744) y dado que no encontramos portadores homocigotos para el alelo de riesgo no fue posible evaluar el modelo (dominante, recesivo o aditivo) bajo el cual esta variante contribuye a la etiología del asma.

Tabla 7. Análisis comparativo de la distribución del SNP *IL-17F* rs2397084 entre casos con asma infantil y controles

SNP	Frecuencia %		OR [95 % IC]	P
	Controles n (418)	Casos n (403)		
rs2397084 (T/C)	3.1	1.1	0.352 [0.164-0.755]	0.00518
Genotipo				
TT	392	394		
TC	26	9		
CC	0	0		
TT vs TC			0.344 [0.159-0.744]	0.004

OR: Odds ratio, P= significancia estadística 0.05, IC: intervalo de confianza

Cuando se llevó a cabo el análisis de haplotipos, no se observó evidencia de desequilibrio de ligamiento (LD) entre las tres variantes analizadas (Fig. 6). Mediante este análisis se obtuvieron 4 haplotipos con una frecuencia mayor al 1 %: TTT, TCT, TTC y GTT. El único haplotipo (TTC) que mostró diferencias estadísticamente significativas fue el que contenía el alelo de riesgo del SNP rs2397084. Después de la estratificación por género, el número de haplotipos identificados en la población masculina fue el mismo que en la población femenina (4), excepto que en esta última el haplotipo GTT presentó una frecuencia menor al 1%. Al igual que lo que se observó en el análisis de los alelos, las diferencias estadísticamente significativas detectadas en la distribución de los haplotipos entre casos y controles; el haplotipo TTC presentó una distribución diferencial únicamente en población femenina (controles: 0.8 vs casos: 3.7%, $p = 0.022$, OR= 0.41, 95% IC: 0.17-0.95) (Tabla 8).

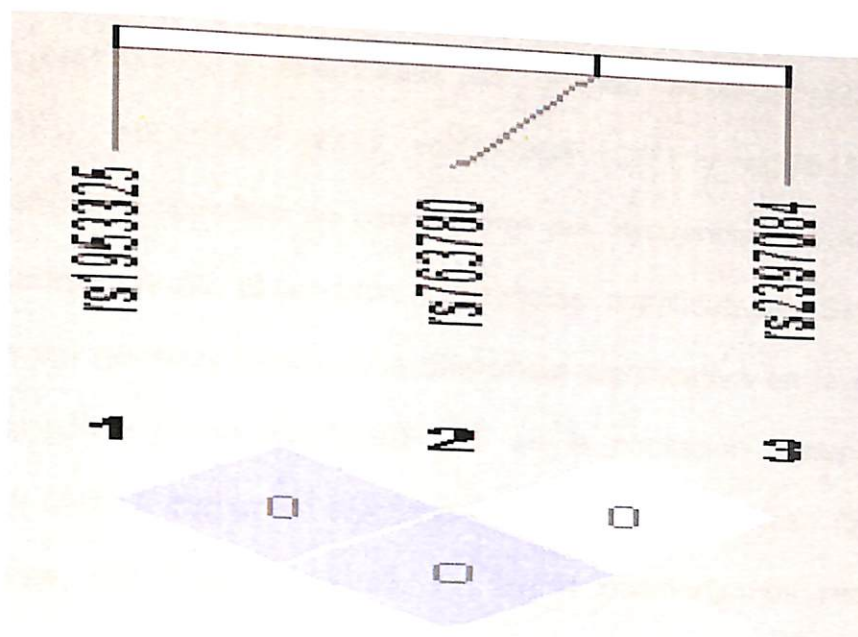


Figura 6. Análisis de LD entre 3 SNPs del gen *IL17-F*. Los valores de LD se reportan en r^2 . No se observa LD entre los 3 SNPs analizados.

Tabla 8. Análisis comparativo de la distribución de haplotipos del gen *IL17-F* entre casos con asma infantil y controles

Haplotipo	% Masculinos		<i>P</i>	% Femeninos		<i>P</i>
rs2397084 (T/C) rs763780 (T/C) rs1953325 (T/G)	Casos	Controles		Casos	Controles	
TTT	91.4	90.0	0.865	95.0	91.6	0.116
TCT	5.2	4.8	0.870	3.2	4.0	0.657
TTC*	1.5	2.6	0.296	0.80	3.7	0.027
GTT	1.8	1.4	0.579			

P : significancia estadística (0.05) , * OR : 0.41, IC 95% [0.17-0.95]

VI.2.2 Análisis de asociación entre casos y controles de SNPs en el gen *FOXP3*

Los 5 polimorfismos estudiados en el gen *FOXP3*, rs2294021 (T/C), rs2280883 (T/C), rs2232367 (C/T), rs2232365 (C/T) y rs3761549 (G/A), se encontraron en HWE. Cuando se compararon las frecuencias de los alelos entre casos y controles no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, la estratificación por géneros mostró una diferencia significativa en la distribución de los alelos del polimorfismo rs2232367 C/T en la población femenina, siendo la frecuencia del alelo T mayor en los casos que en los controles (3.1 vs 0.57 %, respectivamente; OR 5.351, $p=0.035$). En los 4 polimorfismos restantes no se encontraron diferencias significativas de las frecuencias alélicas entre casos y controles (35 vs. 38%, $p=0.389$; 1.7 vs. 2.0%, $p=0.524$; 33 vs. 34%, $p=0.121$; 15 vs. 16%, $p=0.892$) (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis comparativo de la distribución de SNPs en el gen *FOXP3* entre 116 casos con asma infantil y controles femeninos

SNP	%		OR [95% IC]	P
	Controles (173)	Casos (116)		
rs2280883 T/C	1.7	2.0	0.807 [0.525-1.240]	0.524
rs2232367 C/T	0.57	3.1	5.351 [1.102-25.990]	0.035
rs3761549 G/A	15.0	16.0	0.969 [0.618-1.521]	0.892
rs2232365 C/T	33.0	34.0	0.763 [0.542-1.075]	0.121
rs2294021 T/C	35.0	38.0	0.860 [0.610-1.213]	0.389

OR: Odds ratio, P= significancia estadística 0.05, IC: intervalo de confianza

Para incrementar el poder estadístico de nuestro estudio, la población se escaló de 116 a 151 individuos; sin embargo, en este nuevo análisis no se mantuvo la significancia estadística ($P = 0.09$) (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis comparativo de la distribución de SNPs en el gen *FOXP3* entre 151 casos con asma infantil y controles femeninos del SNP rs2232367

SNP	% del alelo menor		OR [IC 95 %]	P
	Controles n (173)	Casos n (151)		
rs2232367	0.57	2.4	4.081 [0.841-19.798]	0.090
Genotipo				
CC	171	144		
CT	2	7		
TT	0	0		
CC vs CT			4.156 [0.85-20.321]	0.057

OR: Odds ratio, P = significancia estadística = 0.05, IC: intervalo de confianza

Dado que el gen *FOXP3* se localiza en el cromosoma X y el programa HAPLOVIEW sólo acepta análisis diploide, el análisis de haplotipos sólo fue posible en la población femenina. Se encontró evidencia de LD mayor a 90 entre los SNPs *rs2232365* y *rs2294021* ($r^2 = 92$) (Fig. 7) y se identificaron 6 haplotipos (TTTTG, CCCCg, CTCCA, CTCCG, TTTTG, TTCCG) con una frecuencia mayor al 1%. Sólo el haplotipo TTTTG mostró diferencias estadísticamente significativas en su distribución entre casos y controles (3.8 vs 0.5%, OR 5.18 $p = 0.022$). Es importante mencionar que el comportamiento de este haplotipo está determinado por el alelo T del SNP *rs2232367* que mostró asociación en el análisis comparativo de la distribución de SNPs (Tabla 11).

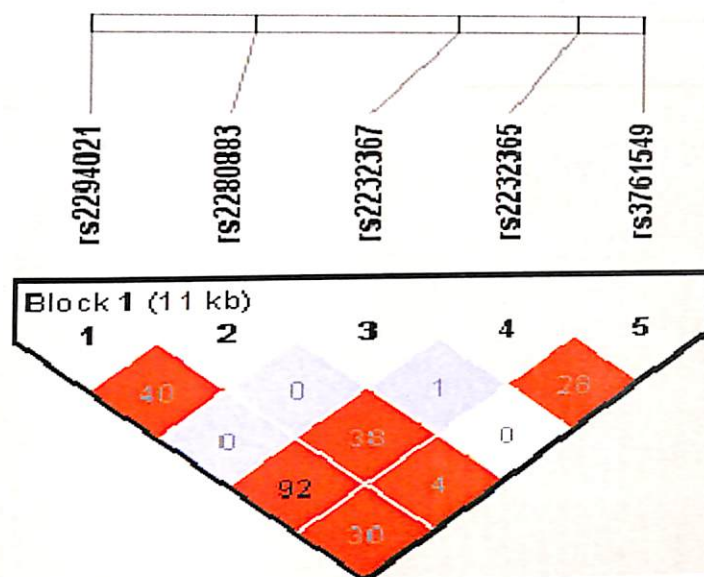


Figura 7. Análisis de LD entre los SNPs del gen *FOXP3*. Los valores de desequilibrio de ligamiento se reportan en r^2 . Se observa LD entre los SNPs *rs2232365* y el *rs2294021*.

Tabla 11. Análisis comparativo de la distribución de haplotipos en el gen *FOXP3* entre casos con asma infantil y controles

Haplotipo 1.rs2294021(T/C) 2.rs2280883 (T/C) 3.rs2232367 (C/T) 4.rs2232365 (C/T) 5.rs3761549 (G/A)	% del haplotipo		P
	Casos	Controles	
TTCTG	61.8	59.0	0.509
CCCCG	16.1	19.0	0.258
CTCCA	14.0	15.5	0.620
CTCCG	2.8	2.2	0.734
TTTTG*	3.8	0.5	0.022
TTCCG	0.4	2.0	0.141

* TTTTG: OR= 5.18, P= 0.022

VI.2.3 Análisis de asociación entre casos y controles de SNPs en el gen *ETS1*

Se analizaron 5 polimorfismos del gen *ETS1*: rs4497423 (T/C), rs1940745 (A/C), rs1275392 (A/G), rs1128334 (T/C) y el rs4937333 (T/C). En ninguno de los SNPs analizados se encontraron diferencias estadísticamente significativas de la distribución de los alelos entre controles y casos (rs4497423: 31.9 vs 30.4%; rs1940745: 30.0 vs 31.8%; rs1275392: 31.5 vs 30.9%; rs1128334: 5.2 vs 6.3% y rs4937333: 42.0 vs 39.0%) (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis comparativo de la distribución de SNPs en el gen *ETS1* entre casos con asma infantil y controles

SNP	% de alelo menor		OR [95 % IC]	P
	Controles	Casos		
rs4497423 (T/C)	31.9	30.4	1.003 [0.801-1.257]	0.976
rs1940745 (A/C)	30.0	31.8	0.939 [0.745-1.161]	0.520
rs1275392 (A/G)	31.5	30.9	0.993 [0.794-1.243]	0.952
rs1128334 (C/T)	5.2	6.3	0.812 [0.514- 1.281]	0.372
rs4937333 (C/T)	42.0	39.0	1.112 [0.912-1.394]	0.268

OR: Odds ratio, P= significancia estadística 0.05, IC: intervalo de confianza

El análisis de haplotipos mostró, que los polimorfismos rs4497423 (T/C), rs1940745 (A/C), 1275392 (A/G), localizados en una región aledaña a 5' UTR del gen forman un bloque de alto LD ($r^2= 93$ y $r^2= 94$), mientras que los dos SNPs que se encuentran en la región 3' UTR, no se encontraron en LD ($r^2= 3$) (Fig. 8).

Considerando solamente a los SNPs que formaron el bloque de LD, se identificaron 3 haplotipos con frecuencia mayor al 1 %. En este bloque se formaron los haplotipos TAA, CCG y CAA presentándose con una frecuencia mayor al 1%. El análisis comparativo de de las frecuencias de los haplotipos entre casos y controles no mostró diferencias estadísticamente significativas (TTA: $p= 0.9432$, CCG: $p= 0.959$, CAA: $p= 0.749$) (Tabla 13).

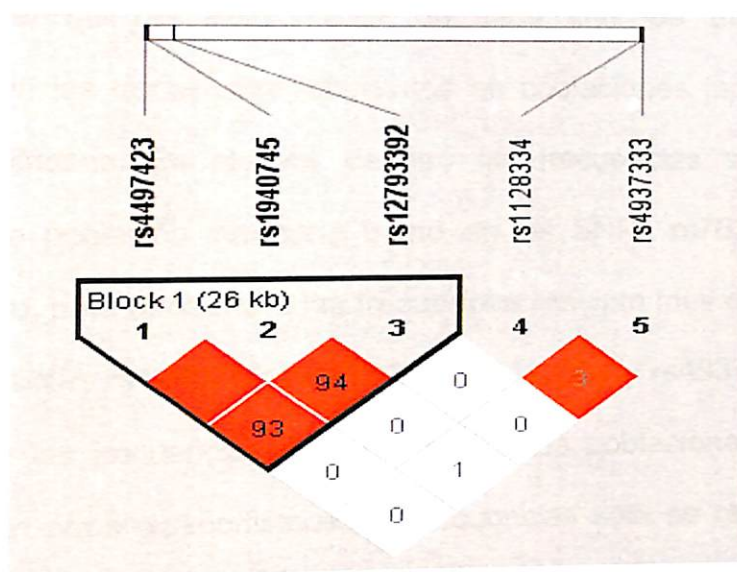


Figura 8. Análisis de LD entre los SNPs en el gen *ETS1*. Los valores de LD se reportan en r^2 . Se observa un bloque con alto LD entre los SNPs rs1275392, el rs1940745 y el rs4497423.

BIBLIOTECA UACM

Tabla 13. Análisis comparativo de la distribución de haplotipos en el gen *ETS1* entre casos con asma infantil y controles

Haplotipo 1.rs4497423,2.rs 1940745, 3.rs1275392 *	% haplotipo Casos	% haplotipo Controles	<i>P</i>
TAA	67.6	67.5	0.9432
CCG	31.2	31.1	0.9596
CAA	1.1	1.0	0.7491

* 1. rs4497423 (T/C), 2. rs1940745 (A/C) 3: rs1275392 (A/G)

Por último, la comparación de las frecuencias alélicas de los SNPs analizados, entre la población mexicana y otras poblaciones se muestran en la tabla 14. Las frecuencias del alelo menor de cada uno los SNPs analizados se compararon con las frecuencias reportadas en poblaciones japonesa, la china, la caucásica y africana. En algunos casos las frecuencias son similares a las encontradas en población mexicana como en los SNPs rs763780, rs2397084, y rs4497423; pero, para otros SNPs las frecuencias resultan muy divergentes como en el caso de los SNPs rs1940745, rs1275392, rs1128334 y rs4937333. Es importante mencionar que las frecuencias alélicas en algunas poblaciones no han sido aún reportadas y en otros polimorfismos las frecuencias sólo se reportan en 2 de las cuatro poblaciones encontradas en las bases de datos, como en el caso de los polimorfismos: rs1953325 y del rs2232367 lo que no posibilita la comparación con las frecuencias obtenidas en este estudio.

Tabla 14. Comparación con respecto otras poblaciones de los frecuencias del alelo menor de los SNPs analizados en la población mexicana

Gen	SNP	% Mex.	% Asia. JPT	% Asia HCB	% Eur.	% Sub- Sah. African.
IL17-F	rs1953325	1.4	-	-	7.5	1.0
	rs763780	4.5	14.4	12	5	6.7
	rs2397084	3.1	1.0	1.1	8.3	1.0
FOXP3	rs2294021	35	44	42	54	50
	rs2280883	1.7	17	19	37.5	3.3
	rs2232367	0.57	-	-	5	1.0
	rs2232365	33	-	-	-	-
	rs3761549	15	27.3	23.3	16.7	5.0
ETS1	rs4497423	32	20	28	44	68
	rs1940745	30	18	25	43	32
	rs1275392	31.5	16	21	40	36
	rs1128334	5.2	44	33	7.8	10
	rs4937333	42	50	47	48	16

Los valores presentados se expresan en porcentaje del alelo menor de cada uno de los SNPs. Los valores reportados para población mexicana son las frecuencias del alelo menor de cada SNP , estimadas en el grupo de controles únicamente. (-) indica valor no reportado en la base de datos

VII. DISCUSIÓN

El asma es una enfermedad compleja causada por la interacción de múltiples genes de pequeño a gran efecto y por factores ambientales. Casi todos los estudios genómicos del asma se han dedicado al análisis de alelos con una frecuencia mayor al 5%, sin embargo, existe la hipótesis de que las variantes raras o poco comunes en las poblaciones son las que tienen mayor influencia en la susceptibilidad de las enfermedades complejas (*Kawaguchi M y cols, 2006*).

Hasta la fecha se han identificado más de 120 genes cuyos polimorfismos confieren riesgo, modifican la gravedad o modulan la respuesta al tratamiento en el asma. Sin embargo el conocimiento de las bases genéticas de la enfermedad es todavía un reto, ya que los análisis genéticos de pacientes asmáticos realizados en distintos países han mostrado que el efecto de cada uno de estos polimorfismos en la susceptibilidad para asma es diferente entre poblaciones y aún dentro de los individuos de una misma población (*Jiménez M 2009, Vercelli D 2009*).

En el presente trabajo se llevó a cabo un estudio de asociación caso-control para determinar si variantes genéticas en genes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria, particularmente en la diferenciación y proliferación de las células Th17, son factores de riesgo para padecer asma en la población infantil mexicana.

En el estudio se incluyeron 13 SNPs localizados en los genes candidato *IL17F*, *FOXP3* y *ETS1*. De los 4 SNPs localizados en el gen de *IL17F*, sólo se observó asociación con el SNP rs2397084 ($p= 0.00518$, OR 0.352). La asociación de este SNP se reforzó con los hallazgos en el análisis de los haplotipos. En este análisis se identificó que de los 4 haplotipos de este gen, el único que se encontró asociado

(TTC), contenía el alelo menos común del polimorfismo rs2397084 ($p=0.027$), por lo que es posible que el comportamiento de este haplotipo se deba a la presencia del alelo mencionado. Hasta la fecha se han reportado 2 estudios de asociación con asma que incluyen variantes alélicas localizadas en este gen. En uno de ellos, Kawaguchi y cols. (2006), demostraron que el genotipo C/C de rs763780 confería protección para asma en una población Japonesa. En el otro estudio, Ramsey y cols (2005) probaron un total de 50 SNPs en población femenina norteamericana, sin embargo, ellos no encontraron asociación entre asma y las variantes estudiadas, incluyendo al SNP rs763780. Aunque en este estudio no se encontró asociación entre el polimorfismo rs763780, cabe mencionar que en ninguno de estos 2 análisis se incluyó al SNP rs2397084, sin embargo, es interesante notar que tanto el rs2397084 como el rs763780 (asociado en población japonesa), se localizan en el exón 3 y ambos son no sinónimos (rs2397084: E126G y rs763780: H161R) y muestran el mismo efecto de protección en las poblaciones en las que se han asociado. Por otra parte, el que ambos polimorfismos sean de sentido erróneo que conduce el cambio de aminoácidos en la proteína, podría alterar su función. En un análisis funcional *in vitro* con la variante H161R, Kawaguchi y cols. (2006), demostraron que el alelo 161R conduce a una pérdida de la capacidad de IL17-F para inducir la expresión de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias en células epiteliales bronquiales. Los resultados controversiales entre la población japonesa y el presente estudio, en relación con el SNP rs763780, apoyan las evidencias que señalan que los factores genéticos que contribuyen al riesgo para asma no son los mismas en todas las poblaciones. Así mismo, considerando que en nuestro estudio no se identificó LD (r^2) entre estos marcadores no se descarta la posibilidad de que

la asociación observada del rs2397084 con la etiología de la enfermedad se deba a otros factores.

En otro sentido, el análisis de los SNPs en el gen *FOXP3* en 116 pacientes femeninos mostró asociación significativa únicamente entre el SNP rs2232367 y el asma ($p= 0.035$), sin embargo al incrementar la muestra a 151 pacientes, sólo se observó una tendencia ($p= 0.090$). Estos resultados podrían ser explicados por el pequeño número de muestra analizada al estratificar por género, por lo que es necesario incrementar el poder estadístico con un mayor número de muestra para obtener resultados más confiables. Hasta el momento no hay reportes sobre estudios de asociación de este polimorfismo con asma o fenotipos asociados y tampoco se conoce el efecto funcional que tiene el SNP en la proteína. Este SNP se localiza en el exón 8 y es un SNP sinónimo y a la fecha no se conocen completamente los efectos de SNPs sinónimos en la actividad de la proteína, pero se ha documentado que algunos de estos cambios en los codones pueden afectar la tasa de traducción de la proteína (*Hunt R y cols 2009*). De tal manera que si este SNP causara una menor expresión del factor de transcripción Foxp3 y una disminución de las células Treg en los pacientes asmáticos, esto podría reflejarse en una mayor proliferación de células Th17 y consecuentemente en un aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias IL17. Esta hipótesis podría apoyarse en el trabajo de Matsumoto y cols (2009) quienes demostraron que las células Treg y los niveles de FoxP3 son menores en pacientes asmáticos que en individuos sanos. Así mismo, Lee y cols en el 2009 demostraron que la expresión de FoxP3 estaba disminuida en las secreciones nasales de pacientes alérgicos en comparación con el grupo control.

Continuando con las variantes localizadas en los factores de transcripción reguladores de la diferenciación de las células Th17; en este trabajo también se incluyeron tres SNPs aledaños a *EST1* que en un análisis preliminar con microarreglos, realizado en nuestro grupo sugirieron asociación a asma (rs1940745, rs4497423 y rs12795392). Después de un análisis bioinformático, se determinó que estos SNPs se localizan en la región intergénica entre la región 5' UTR del gen *ETS1* y un pseudogen; por lo que se seleccionaron otros dos SNPs hacia la región 3' del gen (rs1128334 y rs4937333).

Nuestro análisis no mostró diferencias estadísticamente significativas entre la distribución de los SNPs estudiados (rs1940745: $p = 0.520$, rs4497423: $p = 0.976$, rs1275392: $p = 0.952$, rs1128334 $p = 0.372$, rs4937333: $p = 0.268$). Nuestros datos muestran que estos polimorfismos no contribuyen al riesgo o protección para padecer asma, sin embargo, para confirmar o descartar la participación de variaciones en la secuencia del gen *ETS1* en la etiología del asma será necesario evaluar otros polimorfismos como variaciones en el número de copias (CNVs) u otros SNPs localizados en este gen, particularmente los de las regiones codificantes para dominios involucrados en la unión de este factor de transcripción con sus genes blancos o realizar un análisis de expresión en pacientes asmáticos (*Dittmer J 2003, Wang Y 2010*).

Hasta la fecha no se han reportado en la literatura estudios de asociación en asma y fenotipos asociados que incluyan SNPs en el gen *ETS1*, pero existe evidencia experimental que muestra que este factor de transcripción puede estar implicado en la fisiopatología de esta entidad y fenotipos asociados. Nakamura y cols. en el año 2004 demostraron que Ets-1 podía regular la expresión de metaloproteínasa-9 y de tenascina, que se sabe que son proteínas relacionadas en

la remodelación de tejidos y en la modificación de la gravedad en asma. Por otra parte, en el año 2007 Moissan y cols reportaron que modelos murinos Knock Out para *ETS1*, presentaron niveles elevados de células Th17 e IL-17 en tejido pulmonar, junto con producción excesiva de moco en vías aéreas. Además, se ha encontrado que modelos murinos deficientes de este factor de transcripción presentan una enfermedad parecida a LES, caracterizada por altos niveles de anticuerpos y de células Th17 autorreactivas, sugiriendo su participación en procesos inflamatorios (Yang W, Shen N 2010).

El análisis comparativo de las frecuencias alélicas entre la población mexicana y otras poblaciones reportadas (tabla 14) demostró, de forma general, una vez más la heterogeneidad genética entre las poblaciones, lo que apoya el hecho de que es necesario realizar estudios de asociación en genes involucrados en la fisiopatología del asma en nuestra población para determinar las variantes propias involucradas que puedan tener un significado funcional y genético importante.

En resumen, éste es uno de los pocos análisis que reportan a un SNP de protección para asma en el gen *IL17-F* y que sugiere que un SNP en el gen *FOXP3* presenta una tendencia de riesgo en población infantil mexicana. Conocer el efecto de estos SNPs en la función de las proteínas, deberá ser uno de los principales objetivos de estudios posteriores.

VIII. CONCLUSIONES

Nuestros datos sugieren que:

1. Polimorfismos en el gen *IL17-F* confieren protección para padecer asma en los niños mexicanos.
2. Existe una relación género-dependiente de polimorfismos en el gen *IL17F* asociados a asma.
3. Es necesario incrementar el número de muestra y evaluar el efecto de la sustitución de aminoácidos en el SNP rs2397084 en la función de la proteína.
4. SNPs localizados en el gen *FOXP3* y *ETS1* no confieren protección o susceptibilidad para padecer asma.
5. Existen diferencias en la distribución de los SNPs analizados entre la población mexicana y otros grupos étnicos.

IX. REFERENCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober SP. Inmunología celular y Molecular. España 2004, 4ª ed. ed McGraw-Hill interamericana. Pp:111-20
- Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord G. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clinical and Experimental Immunology* 2007; 148: 32-46.
- Arbes J S et al. Asthma cases attributable to atopy: results from the third national health and nutrition examination survey. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2007;120 (5): 1139-1145.
- Awasthi A, Kuchroo V. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *International immunology* 2009; 21(5): 489-98.
- Ayyoub M et al. Human memory FoxP3⁺ tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the Th17 lineage-specific transcription factor RORgamma-t. *PNAS* 2009. 106(21):8635-8640.
- Baca V, Orozco L. La genética de las enfermedades complejas en: la frontera: Genética Molecular de la enfermedad. Ed. Insituto Politécnico Nacional 2004. Cap 3, pp: 77-91.
- Barnes JP. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature* 2008, 8: 183-191.
- Barrientos RR. Identificación de la mutación $\Delta F508$ en el gen CFTR y de SNPs en genes candidatos y su asociación con asma en pacientes pediátricos Mexicanos. México 2008. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de la Ciudad de México.
- Bateman ED, Fitzgerald M. GINA report (Global Initiative for Asthma). Global strategy for asthma management and prevention 2008. Capítulos: 1-5.
- Bel EH. Clinical phenotypes of asthma. *Current Opinions in Pulmonary Medicine*. 2004;10:44-50.
- Bottema RW et al. X Chromosome Forkhead Box P3 polymorphisms associate with atopy in girls in three dutch cohorts. *Allergy* 2010. 65(7): 865-74
- Cardell HJ, Clayton GD. Genetic association studies. *The Lancet* 2005. 366;24: 1121-31.

Chen Z, Laurence A, O'Shea J. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Seminars in immunology* 2008; 19(6): 400-08.

Chen Z, O'Shea JJ. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunology Research* 2008; 41:87-102.

Chiang CH, Tang YC, Lin MW, Chung MY. Association between the IL-4 promoter promoter polymorphisms and asthma and severity of hiperresponsiveness in Taiwanese. *Respirology* 2007; 12:42-8.

Choudry S, Seibold M, Borrell N. Dissecting complex diseases in complex populations; Asthma in Latino Americans. *Proccedings of the american Thoracic Society* 2007;4: 227-233.

Craig PH et al. Comprehensive testing of positionally cloned asthma genes in two populations. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2007; 176: 849-57.

Daley D et al. Analyses of associations with asthma in four asthma population samples from Canada and Australia. *Hum Genet* 2009; 125:445-459.

Denise L, Choudry S, Ung N. ADAM33 is not associated with asthma in Puerto Rican and Mexican Populations. *American Journal of Respiratory Care Medicine* 2003; 168:1312-1316.

Dittmer J. The biology of the ETS1 proto-oncogene. *Molecular cancer reviews* 2003; 2: 1-21.

Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nature rev/immunol* 2006; 6: 329-33.

Freeman LJ. Copy number variation: New insights in genome diversity. *Genome research* 2009: 949-59.

Galanter J, Choudry S, Eng C. ORMDL3 gene is associated with asthma in three ethnically diverse populations. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2008; 177: 1194-1200.

García OH, Velázquez CR, Rosales EF, Jiménez MS, Baca V, Orozco L. Association of *TLR7* copy number variation with suceptibility to childhood-onset systemic lupus erythematosus in Mexican population. *Annals of the Reumatic diseases Diseases* 2010.1-5.

He JQ, Chang-Yeung M, Becker AB. Genetic variants of the IL13 and IL4 genes and atopic diseases in at-risk children. *Genes and Immunity* 2003; 4:385-9.

Heizmann A, Mao XQ, Akaiwa M. Genetic variants of IL13 signalling and human asthma and atopy. *Human Molecular Genetics* 2000; 9:549.59.

- Hancock BD, Romieu I, Sienra-Monge JJ. Genome-wide association study implicates Chromosome 9q21.31 as a susceptibility locus for Asthma in Mexican Children. *Plos GENETICS* 2009; 5(8): 1-9.
- Hannah JG, Gould JH. IgE in allergy and asthma today. *Nature reviews/immunology* 2008 ; 8: 205-215.
- Huerta J, Penagos M. Asma en niños. Intersistemas. México; 2004 1ª ed pp:47-60
- Hunt R, Sauna Z, Ambudkar S, Gottesman M, Sarfaty-Kimchy C. Silent (Synonymous) SNPs: Should We care about them?-Single Nucleotide Polymorphisms, *Methods in Molecular Biology* 2009. Humana Press. Pp: 26-36.
- Ichiyama K, Yoshida H, Wakabayashi Y. Foxp3 inhibits ROR γ t-mediated IL17A mRNA transcription through direct interaction with ROR γ t. *The journal of biological chemistry* 2008;283(25):17003-008
- Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta sanitaria* 2005; 19(4): 331-41.
- Ivaylo I, Zhou L, Littman D. Transcriptional regulation of Th17 differentiation. *Seminars in Immunology* 2007;19(6): 409-417.
- Harold J, Knowles S, et al. Second tobacco smoke in children with asthma: sources of a parental perceptions about exposure in children and parental readiness to change. *Chest* 2008; 133(6): 1367-1364.
- Jiménez-Morales S, Velázquez CR, Ramírez BJ, Martínez AN, Orozco L. Tumor necrosis factor- α is a common genetic risk factor for Asthma. Juvenil Rheumatoid arthritis, and Systemic Lupus erythematosus in a Mexican pediatric population. *Human Immunology* 2009; 70:251-56.
- Jiménez-Morales S. Identificación de SNPs en genes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria asociados a asma infantil. México 2009. Tesis doctoral Universidad Autónoma Metropolitana.
- Kawaguchi M, Takashi D, Nobuyuki H. IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild type IL-17F activity. *Journal of allergy and clinical immunology* 2006; 117(4):795-801.
- Lewin B. Genes IX. México 2008. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. Pp: 609-43.
- Luna AJ , Orozco OE. La frontera: genética de la enfermedad tomo II. México 2004. 1ª ed. Instituto Politécnico Nacional. Cap. 3.

- M Gary, Weiss S T. Asthma in Spanics; state of the art. *American Journal of respiratory and critical care medicine* 2006; 173: 144-163.
- Manian P. Genetics of asthma: A Review. *Chest* 1997; 112(5): 1397-408.
- Martínez Aguilar N E. Etiopatogenia, factores de riesgo y desencadenantes de asma. *Alergia de México* 2009; 56: S10-S23.
- Mc Kinlay, Tymms M, Ross T, et al. The role of ETS-1 in mast cell granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression and activation. *The journal of immunology* 1998.161: 4098-105.
- Miossec P et al. Interleucina 17 y células T colaboradoras tipo 17. *The New Englad Journal of Medicine* 2010.1(1): 4-6
- Moisan J, Grenningloh R, Betelli E, Oukka M, Cheng C-l. Ets-1 negative regulator of Th17 differentiation. *The Journal of Experimental Medicine* 2007. 204(12): 2825-835.
- Nakamura Y, Esnault S, Maeda T, Kelly A, Malter J, Jarjour J. Ets-1 regulates TNF-alfa-induced Matrix Metalloproteinase-9 and Tenascin expression in primary bronchial fibroblasts. *Journal of immunology* 2004. 1945-51.
- Neffen H y cols. Asthma control in Latin America: the Asthma Insights and Reality in Latin America (AIRLA) survey. *Revista Panamericana de Salud Publica* 2005;17(3):191-7.
- Oboki K, Ohno T, Saito H, Nakae S. Th17 and Allergy. *Allergy International* 2008: 57:121-134.
- Ohashi J, Tokunaga K. The power of genome-wide association studies of complex disease genes: statistical limitiaionsof indirect aproaches using SNP markers. *Journal of Human Genetics* 2001; 46:478-482.
- Palmer LJ, Cookson WO. Using single nucleotide polymorphisms as a means to understanding the pathophysiology of asthma. *Respiratory reseseach* 2001, 2:102-112.
- Pértegas D, Fernández P. Cálculo del poder estadístico de un estudio *Atención primaria investigación* 2003:1-7.
- Pinto LA, Stein TR, Kabesch M. Impact of genetics in childhood asthma. *Jornal de Pediatria*. 2008; 84 (4):68-S75.
- Ponce LE, Martínez SE, Ávila HM. Estudios epidemiológicos de casos y controles. Fundamento teórico, variantes y aplicaciones. *Salud Pública de México* 2001; 43(2): 135-50.

Prasad LR, Velázquez CR, Baca V et al. Genetic association of IRF5 with SLE in Mexicans: higher frequency of the risk haplotype and its homozygosity than Europeans. *Human Genetics* 2007; 121(6): 721-7.

Ramsey CD, Lazarus R, Camargo CA, Weiss ST, Celedón JC. Polymorphisms in the interleukin 17F gene (IL17F) and asthma. *Genes and Immunity* 2005; 6: 236-241.

Robinson DS. Regulatory T cells and asthma. *Clinical et experimntal allergy* 2009.1-10.

Rogers JA et al. Assesing reproducibility of asthma candidate gene associations, using Genome-wide data. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2009; 179: 1084-1089.

Romagnani S. Human Th17 cells. *Arthritic Research and Therapy* 2008; 10: 1-8.

Huiling L, Romieu I, Sienra Monge J, et al. Genetic polymorphisms in transforming growth factor beta-1 (TGFB1) and childhood asthma and atopy. *Human Genetics* 2007; 121 (5): 529-538.

Rutter JL Et al. A single nucleotide polymorphism in the Matrix Metalloproteinase-1 promoter creates an ETS binding site and augments transcription. *Cancer research* 1998; 58: 5321-5325.

Saleh A, Shan L, Halayko AJ, Kung S, Gouni AS. Critical role for STAT3 in IL-17A-mediated CCL11 expression in human airway smooth muscle cells. *The journal of immunology* 2009; 3357-365.

Shastri B. SNPs: Impact on gene function and phenotype-Sinlge Nucleotide Polymorphisms, *Methods in Molecular Biology* 2009. Humana Press. Pp: 3-12.

Shen GQ, Abdulliah KG, Wang KQ. The TaqMan method for SNP genotyping-Single Nucleotide Polymorphisms, *Methods in Molecular Biology*. Humana Press.Pp: 293-304.

Sitio electrónico de la Organización Mundial de la Salud: www.who.int/esp/.

Solezzi SI, Miranda HA, Gil EJ et al. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Procedures of the National Academy of Sciences*:1-6.

Song C et al. IL-17-producing Alveolar Macrophages Mediate Allergic Lung Inflammation Related to Asthma. *The journal of immunology* 2008; 181: 6117-124.

- Stram OD. Tag SNP selection for association studies. *Genetic epidemiology* 2004; 27: 365-74.
- Sudeepta A. IL-17 : prototype memeber of an emerging cytokine family. *Journal of leucocyte biology* 2002; 71: 1-8.
- Vargas Becerra M H. Epidemiología del asma. *Alergia México* 2009; 56: S3-S9.
- Vargas Becerra MH. Fisiopatología del Asma. *Revista Alergia de México* 2009; 56: S24-S28.
- Vercelli D. Discovering suceptibility genes for Asthma and Allergy. *Nature Reviews/immunology* 2008; 8: 169-182.
- Villareal BA. Prevalencia de asma y otras enfermedades alérgicas en niños escolares en Ciudad Juárez, Chihuahua. *Salud Pública de México* 2001; 43 (5): 433-443.
- Voo S K. Identification of IL17-producing FOXP3⁺ regulatory T cells in humans. *Procedures of the National Academy of Sciences* 2009; 106(12): 4793-4798.
- Walley AJ, Cookson WO. Investigation of a interleucin 4 promoter polymorphism for associations asthma and atopy. *Journal of Medical Genetics* 1996; 33:689-92.
- Wang S, Rojas W, Parra M et al. Geographic patterns of genome admixture in latin american mestizos. *PLOS genetics* 2008; 4(3): 1-9.
- Wu H, Romieu I, Shi M et al. Evaluation of candidate genes in a genome-wide association study of childhood asthma in Mexicans. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010; 125(2): 321-31.
- Wu H, Sienna MJ et al. Genetic variation in ORM1-like3 (ORMDL3) and gasdermin like (GSDML) and chilhood ; 64 (4): 629-635.
- Wu H et al. Lack of association between genetic variation in G-protein-coupled receptor for asthma susceptibility and childhood asthma and atopy. *Gen and imm* 2008; 9: 224-30.
- Wu H, Romieu I, Sienna MJ Et al. Parental smoking modifies the reation between genetic variation in tumor necrosis factor-alfa (*TNF*) and Chilhood Asthma. *Envirom Health perspectives* 2007. 115 (4): 616-20.
- Yang W, Shen N et al. . Genome-wide association study in Asian populations identifies variants in *ETS1* and *WDFY4* associated with Systemic Lupus Erythematosus. *PLOS genetics* 2010. 6(2): 1-11.

Yang X O et al. TH17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR-gamma. *Immunity* 2008; 28 (1): 29-39.

Zeggini E, Ioannidis J. Meta-analysis in genome-wide association studies. *Pharmacogenomics* 2009; 10(2): 191-201.

Zhang J, Paré DP, Sanford AJ. Recent advances in asthma genetics. *Respiratory Research* 2008; 9(4):1-8.

Zhou L et al. TGF-beta-induced FOXP3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR α function. *Nature* 2008; 453: 233-240.

Ziegler S, Buckner J H. FOXP3 and the regulation of treg/Th17 differentiation. *Microbes Infect* 2009. 11(5): 594-598.

X. GLOSARIO

Alelo: Una de dos o más alternativas de la secuencia nucleotídica de un gen.

Alergeno: proteína o sustancia que induce una reacción alérgica.

Atopia: presencia de altos niveles de IgE en suero y pruebas cutáneas positivas a alérgenos comunes.

Concordancia: pares o grupos de individuos idénticos en fenotipos. Presencia de un carácter entre gemelos.

Cosegregación: herencia conjunta de dos marcadores por su cercanía física o de dos caracteres porque existe una relación entre sí.

Desequilibrio de ligamiento (LD): segregación de dos o más marcadores en un porcentaje mayor al esperado ($> 50\%$) porque existe baja tasa de recombinación entre ellos o es una mutación de origen reciente.

Enfermedad compleja: patología que resulta de la interacción de varios factores ambientales y genéticos y que no muestra un patrón de herencia definido.

Enfermedad monogénica: entidad causada por mutaciones en un solo gen.

Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE): la composición genética de una población se mantiene en equilibrio mientras no existan factores como la selección natural, la endogamia, nuevas mutaciones, etc. Que la modifiquen. Desviaciones en el HWE pueden ser resultados de errores de genotipificación o una asociación real entre el marcador y la enfermedad.

Estratificación: la presencia de muestras de individuos con diferente historia demográfica y ancestral. Población que contiene subgrupos que puede ser como consecuencia de apareamientos no azarosos, consanguineidad, etc.

Estudio de ancestría: evaluación del componente ancestral de una población.

Falsa asociación: Asociación positiva debida a estratificación de la muestra.

Estudio de asociación: análisis que busca relacionar un marcador genético con la enfermedad en una población.

Estudio caso-control: compara la frecuencia con la que un marcador se encuentra en un grupo de individuos afectados con la que se detecta en individuos sanos.

Frecuencia alélica: porcentaje de un alelo determinado en una población.

Frecuencia genotípica: proporción en la que se observan los genotipos de una población de un locus específico.

Gen candidato: gen que por su función puede tener una participación relevante en la etiología de la enfermedad.

Genome Wide Scan o Estudio amplio del genoma: estudios en los que un arreglo denso de marcadores genéticos, los cuales capturan una proporción sustancial de variaciones comunes en la secuencia del genoma es tipificado en un set de muestras de DNA que son informativas para un rasgo de interés.

Genotipo: alelo específico o conjunto de genes de un individuo.

Haplotipo: conjunto de marcadores que se heredan en bloque.

Hiperrespuesta bronquial: respuesta excesiva a alérgenos ambientales.

Heredabilidad: fracción de la variabilidad fenotípica que es atribuible a los genes.

Heterocigoto: individuos con alelos diferentes en un locus.

Homocigoto: individuos con alelos idénticos en uno o más loci.

Locus (plural Loci): lugar de un cromosoma donde se localiza un gen dado.

Odds Ratio (OR): cociente entre la probabilidad de que un evento suceda y de que no suceda. Forma de comparar si la probabilidad de que ocurra un evento es el mismo. Un $OR = 1$, implica que la probabilidad de que ocurra un evento o se presente una enfermedad entre los grupos de estudio es igual.

Polimorfismo genético: coexistencia estable de dos o más alelos en una población.

Sonda: molécula de DNA que permite identificar genes o secuencias específicas de genes en una secuencia de DNA.



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 _____

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

☐ ☐

Dosis _____

B2-agonistas acción prolongada

☐ ☐

Dosis _____

Esteroides

☐ ☐

Dosis y tipo _____

Antileucotrienos

☐ ☐

Dosis _____

Xantinas

☐ ☐

Dosis _____

Otros

☐ ☐

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

TESIS COPILCO
TESIS
ENCUADERNACIÓN

Medicina No 24 Interior P.B. Copilco Universidad
Coyoacan, 04360, México, D.F.
Tels. 5659 3435, 5658 1553
tesiscopilco@hotmail.com
tesis@tesiscopilco.com