



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

---

**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA**

**“ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO EN LOS GENES STAT 1, STAT 3, STAT 4 Y STAT 6 Y EL RIESGO A DESARROLLAR ASMA ALÉRGICA EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA”.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:

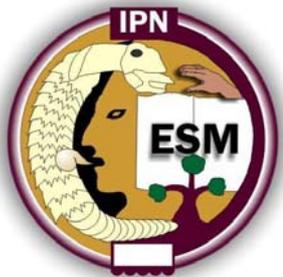
Maestría en Ciencias de la Salud

**P R E S E N T A**

**DR. EFRAÍN NAVARRO OLIVOS**

Directores:

Dra. Lorena Orozco Orozco  
Dra. Norma Estela Herrera González



MÉXICO, D. F.

DICIEMBRE 2009



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-14

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 10:00 horas del día 18 del mes de Noviembre del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M. para examinar la tesis de titulada:

**“ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMO DE UN SOLO NUCLEÓTIDO EN LOS GENES STAT 1, STAT 3, STAT 4 Y STAT 6 Y EL RIESGO A DESARROLLAR ASMA ALÉRGICA EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA”.**

Presentada por el alumno:

**NAVARRO**

Apellido paterno

**OLIVOS**

Apellido materno

**EFRAIN**

Nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	5	2	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISIÓN REVISORA**

Director de tesis

DRA. NORMA ESTELA HERRERA GONZÁLEZ

Director de tesis

DRA. LORENA OROZCO OROZCO

DR. ÁNGEL MILITAR GARCÍA

DR. RAFAEL CAMPOS RODRÍGUEZ

DR. AARÓN DOMÍNGUEZ LÓPEZ

DR. ANDRÉS SALAS CASAS

**EL PRESIDENTE DEL COLEGIO**

DR. ELAZAR LARA PADILLA



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA  
 I.P.N.  
 SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
 E INVESTIGACION  
 CONTROL ESCOLAR



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México el día 11 del mes Noviembre del año 2009, el (la) que suscribe NAVARRO OLIVOS EFRAÍN alumno (a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD con número de registro adscrito a LA ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de DRA. NORMA ESTELA HERRERA GONZÁLEZ y cede los derechos del trabajo intitulado “ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO EN LOS GENES STAT 1, STAT3, STAT 4 Y STAT6 Y EL RIESGO A DESARROLLAR ASMA ALÉRGICA EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [cyberefra@hotmail.com](mailto:cyberefra@hotmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

EFRAIN NAVARRO OLIVOS

Nombre y firma

## RESUMEN

**Introducción.** El asma es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta a cerca del 15% de la población infantil mexicana. Se ha reportado que polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) en más de 100 genes candidato son importantes factores de riesgo para desarrollar la enfermedad y que éstos, pueden variar entre las poblaciones. **Objetivo:** Determinar si SNPs localizados en genes de la respuesta inmune e inflamatoria se asocian a la susceptibilidad para desarrollar asma en población pediátrica mexicana. **Material y Métodos:** En un estudio de casos y controles se incluyeron 150 pacientes pediátricos con asma y 450 donadores del banco de sangre como grupo control. A partir de ADN genómico y mediante la técnica de la 5' exonucleasa (TaqMan), se analizaron 22 SNPs localizados en 4 genes candidato (STAT1, STAT3, STAT4 y STAT6).

**Resultados:** Se identificaron SNPs en los genes *STAT1*, *STAT3*, *STAT4* Y *STAT6* como nuevos factores de riesgo genético para asma. Interesantemente, genes que se han asociado con asma en más de 10 estudios independientes no mostraron asociación en nuestra población.

**Conclusión:** Este estudio aporta evidencias de la complejidad genética del asma en la población pediátrica mexicana. Se requiere confirmar si los genes no asociados modifican la gravedad o la respuesta al tratamiento.

## ABSTRACT

**Introduction:** Asthma is a chronic inflammatory airway disease, which affects nearly the 15% of Mexican children. Increasing evidence shows that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in more than 100 candidate genes are important risk factors to develop this disease and they have ethnic differences. **Objective:** The present study was undertaken to determine whether SNPs in genes involved in immune and inflammatory responses are associated with asthma in Mexican pediatric patients. **Material and methods:** One hundred and fifty unrelated asthmatic patients were recruited from four pediatric hospitals in Mexico City. Additionally, 450 healthy blood bank donor controls were included as a control group. The controls were also drawn from Mexico City and sex matched. In all cases, the diagnosis of asthma was assessed by a Pneumonologist or Alergologist. Genotyping was performed using the 5' exonuclease technique (TaqMan) and included 22 SNPs in 4 candidate genes. Data were analyzed using the ADMIXMAP, FINETTI, HAPLOVIEW, EPIINFO programs. **Results:** SNPs in the STAT1, STAT3, STAT4 Y STAT6 genes were identified as new genetic risk factors for asthma. In contrast, genes associated with asthma and related phenotypes in more than 10 studies worldwide, were not associated in our population. **Conclusion:** This study gives evidence of a complex genetic background of asthma in pediatric Mexican patients. Further studies are necessary to identify if these genes are associated with severity of the disease .

## I. INTRODUCCIÓN

El asma es la enfermedad crónica más común en la población mundial, que aún cuando muestra diferencias de prevalencia y gravedad entre las distintas poblaciones, su tendencia al incremento y el elevado costo de su atención hacen de ella un problema globalizado de salud pública. Los reportes de la Iniciativa Global para el Asma (Global Initiative for Asthma: GINA) estiman que la población de asmáticos en el mundo es de más de 300 millones de individuos (Masoli y cols., 2008) y según el Comité del Estudio Internacional del Asma en la Niñez (International Study of Asthma and Allergies in Childhood: ISAAC), cerca del 8% de los niños mexicanos padecen la enfermedad (Pearce y cols., 2007). Sin embargo, los estudios epidemiológicos realizados en nuestro país muestran que la prevalencia del asma en la población infantil es hasta de un 15% (Huerta y Penagos 2004). En un estudio realizado en Europa el tratamiento anual de esta entidad alcanzó 17.7 millones de euros (<http://www.european-lung-foundation.org>) y en EU para el año 2002 se gastaron cerca de 18 millones de dólares (Masoli y cols., 2008). En México, no existen datos precisos sobre los costos de atención de pacientes con asma; sin embargo, un estudio realizado por Ceballos-Martínez y cols., en el año 2003, reportó un gasto de 17,620,517.83 pesos en un Hospital de segundo nivel durante tres años, mientras que Gallardo-Martínez y cols., (2007) estimaron que el costo del asma en México asciende a 32-35 millones de dólares por año.

En años recientes y con la secuenciación del genoma humano se ha generado una gran cantidad de información que está favoreciendo la identificación de los factores causales de muchas enfermedades humanas. Una de las principales aportaciones de este conocimiento ha sido la identificación y ubicación de variaciones de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) en genes que tienen un papel importante en los procesos fisiológicos normales (genes candidato); muchas de estas variantes se han relacionado con el desarrollo, la progresión o la respuesta al tratamiento de entidades complejas. Este

conocimiento tiene repercusiones potenciales en el desarrollo de métodos de diagnóstico y tratamiento más específicos, en la identificación de nuevos blancos terapéuticos y por ende en el diseño de nuevas estrategias preventivas que pueden contribuir a la reducción en los costos de atención de las principales enfermedades crónicas que aquejan a la población mundial, incluyendo al asma.

## **I.1 ASMA**

### **I.1.1 Definición**

El asma es una entidad compleja con un fenotipo muy heterogéneo que se define como un trastorno inflamatorio crónico de las vías respiratorias, caracterizada por obstrucción de las vías aéreas (VA) inferiores, la cual revierte total o parcialmente de manera espontánea o con tratamiento. Clínicamente, esta entidad se identifica por la presencia de tos, disnea (dificultad respiratoria), opresión torácica y estertores sibilantes con episodios recurrentes particularmente durante la mañana o noche. Los síntomas del asma frecuentemente se desarrollan durante los primeros años de vida. Los estudios longitudinales muestran que por lo menos el 60% de los niños asmáticos cursan con sibilancias de las vías respiratorias bajas durante los primeros 3 años de edad (Huerta y Penagos, 2004; GINA, 2007).

### **I.1.2 Diagnóstico clínico**

El diagnóstico clínico del asma se establece principalmente por medio de la exploración física, en la cual se identifica la presencia de síntomas indicadores de obstrucción bronquial tales como tos, disnea, sibilancias, espiración prolongada e hipoventilación. Estos signos obstructivos se presentan en forma recurrente, con exacerbaciones (crisis) en episodios cortos o largos dependiendo de la gravedad de la enfermedad. Por otra parte, la reversibilidad de los síntomas de obstrucción bronquial y la función pulmonar se evalúan mediante espirometría, con la cual se estima el volumen espiratorio forzado por un segundo (FEV1), parámetro

fundamental para establecer el diagnóstico. La obstrucción bronquial debe ser total o parcialmente reversible ante un tratamiento con broncodilatadores, una mejoría del FEV1 mayor del 12% después del tratamiento con salbutamol o albuterol es indicativa del diagnóstico de asma (GINA, 2007).

La presencia de hiperrespuesta bronquial (HRB) es otra característica importante del asma que debe ser considerada durante el diagnóstico y se define como la exacerbación de signos y síntomas a una diversidad de estímulos físicos (ejercicio, cambios de temperatura o humedad ambiental), químicos (olores penetrantes, humo, aspirina, etc.) o emocionales (estrés). Así mismo, aunque en el asma los niveles en suero de IgE total y específica, de la proteína catiónica de eosinófilos y del óxido nítrico en aire exhalado, no son patognómicos de la entidad, resultan parámetros muy útiles para establecer el diagnóstico.

Aunque la historia clínica del paciente, en el examen físico y en los estudios tanto de laboratorio como de gabinete permiten establecer el diagnóstico de asma, la gran variabilidad en su expresión clínica, donde los síntomas pueden ir desde leves hasta muy graves, pueden dificultar su diagnóstico, por lo que en el diagnóstico diferencial deben considerarse otros padecimientos pulmonares como la fibrosis quística, bronquiectasis, disfunción laríngea episódica, insuficiencia cardíaca temprana, enfisema, alergia a alimentos o medicamentos, etc. (Huerta y Penagos, 2004; GINA, 2007).

### **I.1.3 Clasificación**

A lo largo de muchos años se ha intentado clasificar al asma con base en los factores inductores o etiológicos (infecciones, alergenos, drogas, sustancias ocupacionales, etc.) y la gravedad de la enfermedad (el grado de reactividad bronquial, la respuesta terapéutica, etc.).

Con respecto a la clasificación etiológica, el asma se clasifica en extrínseca e intrínseca. El asma extrínseca, también denominada atópica, es más frecuente en niños (60%) y se caracteriza por una exagerada respuesta inmune de tipo 2 (Th2) con presencia de niveles elevados de inmunoglobulina (Ig) E (IgE) en suero,

donde puede demostrarse una reacción antígeno-anticuerpo como desencadenante de la enfermedad. El asma intrínseca o no atópica es un término más amplio y no está asociado a la expresión de antígenos; este tipo de asma suele comenzar en la vida adulta, en muchos casos se asocia con pólipos nasales, sinusitis maxilar, ingesta de aspirina u otros anti-inflamatorios no esteroideos y ejercicio; además, presenta un curso crónico que requiere de esteroides orales para su control (Hinojosa, 1997; GINA, 2007).

La clasificación del asma por gravedad se basa principalmente en el curso y la gravedad de los síntomas (Bel, 2004). Así, el asma se clasifica en intermitente (síntomas menos de una vez a la semana, síntomas nocturnos no mayores a dos veces al mes, FEV  $>$  80% del predicho), persistente leve (síntomas más de una vez a la semana pero menos de una vez al día, síntomas nocturnos en más de dos veces al mes, las exacerbaciones pueden afectar las actividades cotidianas, FEV  $>$  80% del predicho), persistente moderada (síntomas diarios, síntomas nocturnos más de una vez a la semana, los síntomas pueden afectar las actividades cotidianas y el sueño, FEV 60 - 80% del predicho) y persistente grave (síntomas diarios, síntomas nocturnos frecuentes, exacerbaciones frecuentes, los síntomas limitan las actividades cotidianas y el sueño, FEV  $<$  60 % del predicho) (GINA, 2007).

Dada la amplia gama de factores etiológicos y la expresividad tan variable de sus síntomas, actualmente no existe una clasificación ideal.

#### **I.1.4 Fisiopatología**

Durante muchos años se consideró que las alteraciones principales en el asma lo constituían la excesiva producción de moco y el broncoespasmo. Estas observaciones que provenían principalmente de estudios *post mortem* mostraban la presencia de tapones compuestos por moco, proteínas séricas, células inflamatorias y detritus celulares en las VA. Actualmente las evidencias apuntan a que las manifestaciones clínicas de esta enfermedad se deben principalmente a la inflamación crónica y la obstrucción de los conductos respiratorios; procesos que

conducen a una excesiva reactividad bronquial a diferentes estímulos ambientales (alergenos), edema, elevada secreción de moco (hipertrofia de células globosas), formación de nuevos vasos sanguíneos, descamación de las células epiteliales, alteraciones en la estructura y la función de las VA (remodelación), engrosamiento de la membrana basal y contracción del músculo liso (Fig. 1) (Hinojosa, 1997; GINA, 2007).

Las alteraciones en la estructura de las VA, reflejan la importancia de la inflamación crónica recurrente en asma y de hecho, la inflamación es considerada como el factor más directamente relacionado con la gravedad de la enfermedad (Huerta y Penagos, 2004; GINA, 2007). El proceso inflamatorio involucra infiltración de diversos tipos de células (linfocitos, mastocitos, eosinófilos, basófilos, etc), liberación de mediadores celulares (histamina, prostaglandina, leucotrienos, etc.) y secreción de varias citocinas (interleucinas: IL 4, 5 y 13, factor estimulador de crecimiento de colonia de macrófagos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), etc.) (Carroll y cols., 1997; Minshall y cols., 1998; Holgate, 1999) (Fig. 2).

La inflamación crónica es orquestada por los linfocitos T e inicia con la respuesta inmune cuando se activan las células presentadoras de antígenos (CPA: células dendríticas y macrófagos). Los antígenos son procesados y presentados por las CPAs a los linfocitos T colaboradores (Th) no activados (Th0), lo que induce la expresión de IL4. Esta citocina estimula la diferenciación de los linfocitos Th0 a un perfil Th2, caracterizado por la expresión de las ILs 4, 5, 9, 13, etc., así como el receptor de la IL4 (IL4R) y GM-CSF, los que a su vez estimulan la liberación de mayores cantidades de IL4 e IL5, promoviendo así, la síntesis de IgE por los linfocitos B y la liberación de proteínas que inducen inflamación y broncoconstricción (Fig. 2) (Huerta y Penagos, 2004).

Además de que las IL4 e IL13 dirigen la respuesta Th2, éstas también están involucradas en el cambio de isotipos de las IgM a IgE y en la sobrevivencia de las células Th2, ya que al interaccionar IL4 con su receptor inicia la activación

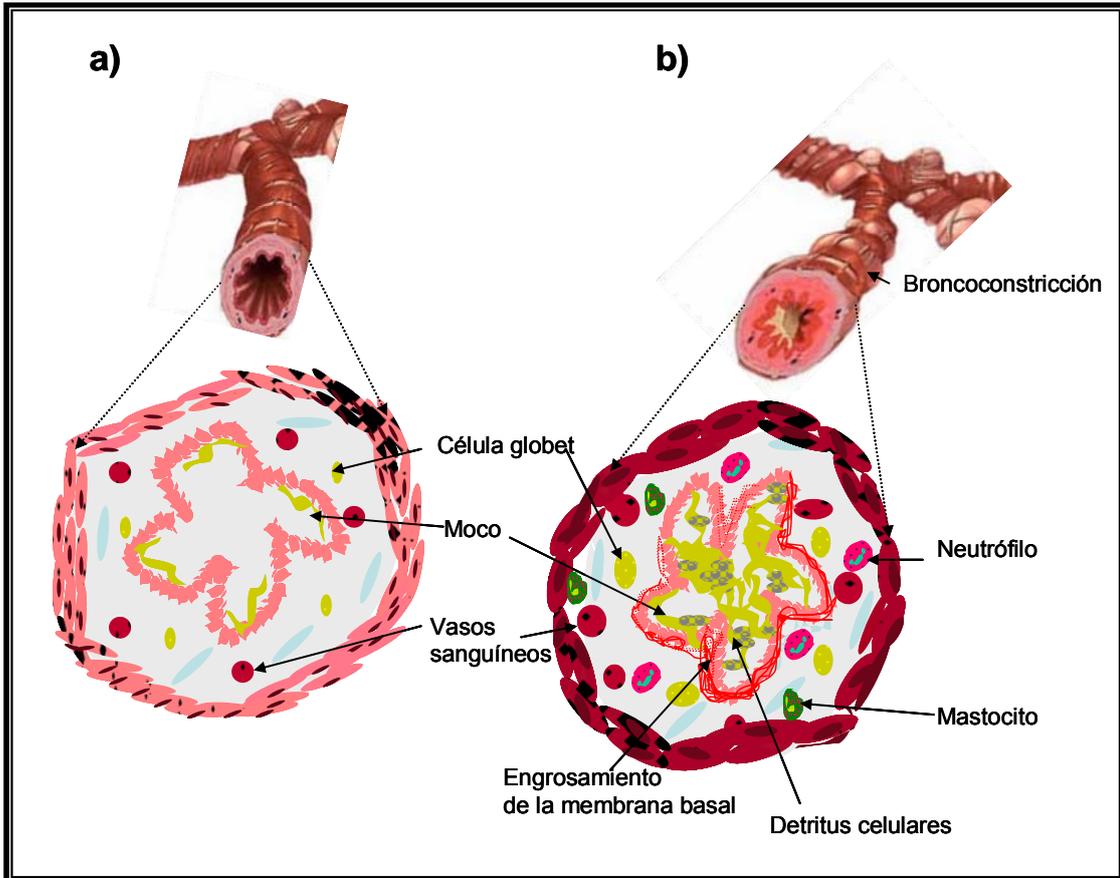


Fig. 1. Representación esquemática de los cambios anatomopatológicos que se observan en las vías aéreas de pacientes asmáticos. a) Bronquiolo normal, b) bronquiolo asmático.

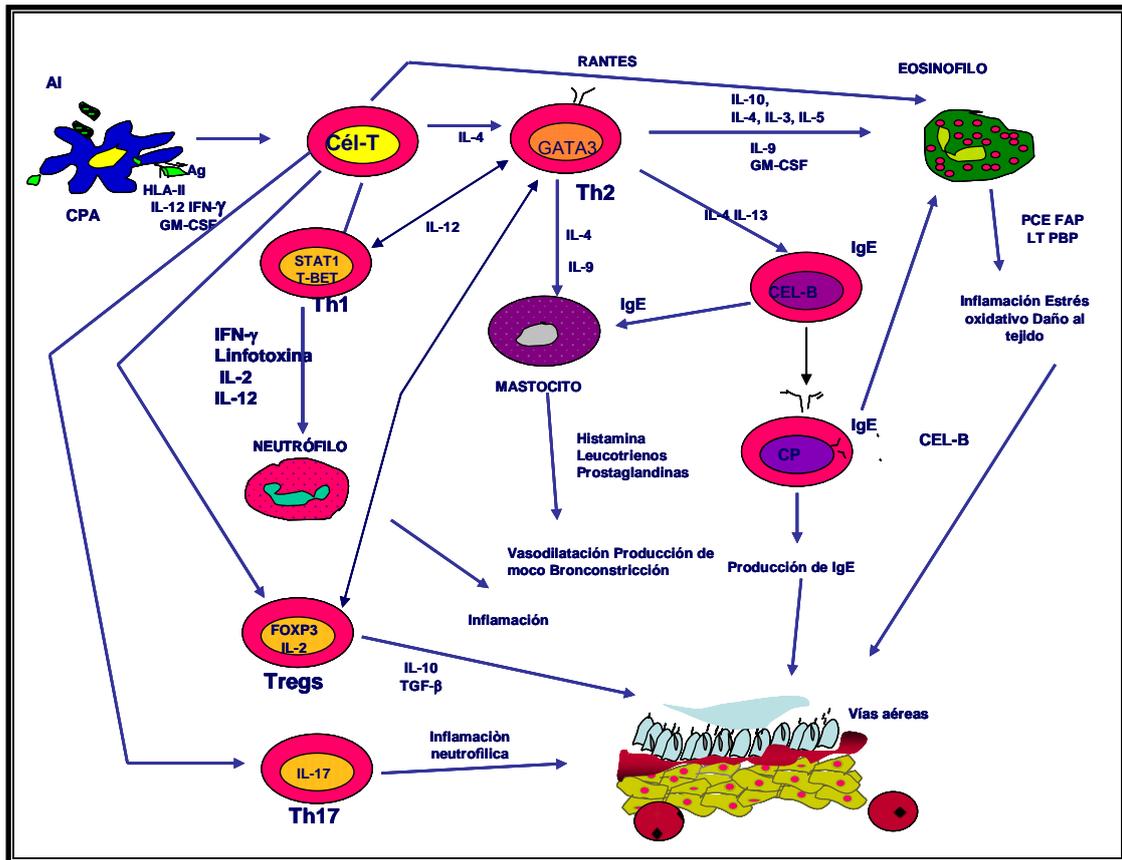


Fig. 2. Representación esquemática de los mecanismos y moléculas involucrados en la patogénesis del asma. CPA: célula presentadora de antígeno; FAP: factor activador de plaquetas; GM-CSF; factor estimulador de crecimiento de la colonia de macrófagos; IgE: Inmunoglobulina E; IFN $\gamma$ : interferón gama; IL: interleucina; LT: leucotrieno; PBP: proteína básica principal; PCE: proteína catiónica de eosinófilos; RANTES: regulado en activación secretado y expresado por células T normales; Th: linfocito T colaborador; Th0: linfocito T no activado; Treg: Linfocito T regulador; STAT1: activador de la transcripción y transductor de señales 1; Tbet: factor de transcripción T-bet; GATA3: proteína 3 de unión a secuencias GATA; FOXP3: factor transcripcional forkhead/winged-helix.

transcripcional de otros genes a través de STAT6 (transductor de señales y activador de la transcripción 6) y se induce la proliferación celular (Moynihan y cols., 2008). *In vitro*, se ha observado que las células del epitelio bronquial y los fibroblastos son altamente responsivos a IL4 e IL13; de hecho la sobreexpresión de IL13 en el epitelio bronquial de ratones transgénicos, no sólo conduce a un aumento en la producción de IgE, también induce a la metaplasia en las células globosas, fibrosis subepitelial, hiperplasia del músculo liso bronquial e HRB (Chen y cols., 2005).

Aunque la inflamación mediada por citocinas Th2 es fundamental en la patogénesis del asma, no es suficiente para que la enfermedad se manifieste. En las VA remodeladas; las citocinas, los mediadores celulares y las moléculas de la matriz aportan un microambiente óptimo para mantener la respuesta inflamatoria crónica y en la forma más grave de la enfermedad se crea un ambiente para el desarrollo de un perfil de citocinas Th1. El perfil Th1 involucra neutrófilos y citocinas pleiotrópicas tales como IL1, TNF $\alpha$  e interferón gama (INF $\gamma$ ). Estas citocinas a su vez son capaces de inducir más estrés celular y daño al tejido. De hecho varias evidencias apuntan a que las citocinas Th1 contribuyen al desarrollo del asma en población infantil (Heaton y cols., 2005; Umetsu y cols., 2005; Holgate, 2008). Las citocinas Th1 activan células endoteliales que aumentan la expresión de moléculas de adhesión intracelular (ICAM1) y de células vasculares (VCAM1) y permiten la infiltración de células proinflamatorias a la mucosa de las VA, así como la activación de eosinófilos y células cebadas, lo cual se refleja en una reacción inflamatoria continua (Popper y cols., 2002). Por su parte, las quimiocinas, también juegan un papel importante, ya que éstas participan en el reclutamiento de las células inflamatorias en las VA; de estas proteínas las más relevantes en asma son: IL8, el ligando 5 de quimiocinas CC (CCL5 o RANTES) y MCP1 (proteína 1 quimioatrayente de monocitos).

Por otro lado, en la última década se ha generado una gran cantidad de evidencias que señalan la importancia de otro grupo de células Th en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria; las células T reguladoras (Tregs) y las Th17

efectoras. Datos recientes, han mostrado que las células Th2 junto con las Th17 favorecen la inflamación, mientras que las Tregs tienen un papel en el proceso antiinflamatorio. Así, la inducción local de células Th2 es críticamente dependiente del balance entre los factores de transcripción de Th1 (T-bet) y Th2 (proteína 3 de unión a GATA: GATA3); mientras que las Th17 y las Tregs requieren de los factores de transcripción receptores relacionados con los receptores de orfanos (ROR) y “forkhead box” P3 (FOXP3) respectivamente. Los datos disponibles actualmente sugieren que el asma es una enfermedad multifacética activamente controlada por los linfocitos T, donde el desequilibrio en la expresión de los factores de transcripción que caracterizan a las poblaciones Th2, Th1, Th17 y Tregs (GATA3, Tbet, ROR y FOXP3, respectivamente) juegan un papel relevante (Finotto, 2008; Paik y cols., 2008).

### **I.1.5 Etiopatogenia**

La participación tanto de células Th2 como Th1 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 dos factores principales: ambientales y genéticos. Existe la hipótesis de que la interacción entre estos factores para el desarrollo de la enfermedad es de una manera inversamente proporcional, es decir, cuando el número de elementos genéticos de riesgo es elevado, se requieren de menos inductores ambientales, la enfermedad aparece a más temprana edad y la gravedad es mayor; mientras que en individuos con poca susceptibilidad genética requieren de una fuerte exposición a inductores ambientales, aparece más tardíamente y la gravedad es menor (Fig. 3).

#### **I.1.5A Factores ambientales**

Dentro de los factores ambientales desencadenantes de las manifestaciones clínicas se incluyen principalmente, la exposición a agentes domésticos (plumas de animales, ácaros, pelo de gatos, caspa de animales, moho, etc.), químicos (tabaco, aspirina, ozono, dióxido de nitrógeno, azufre,

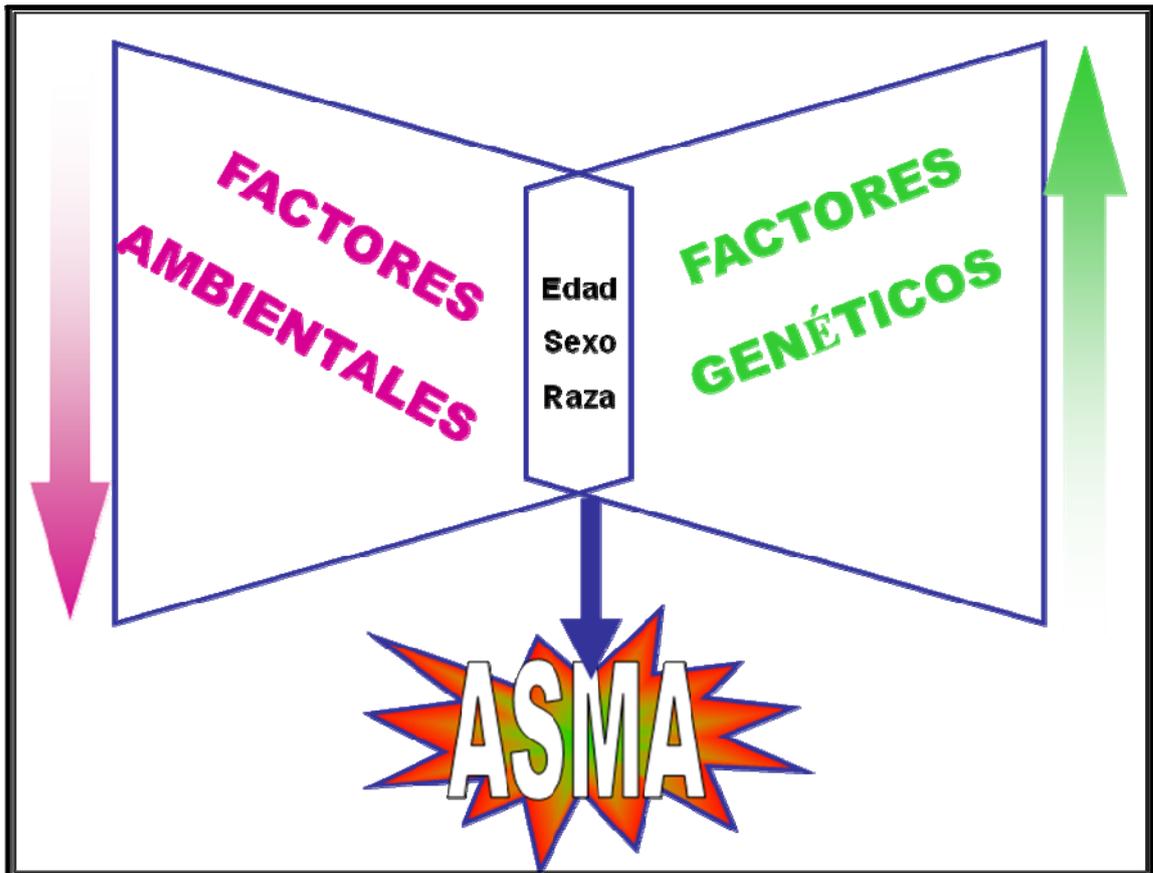


Fig. 3. Etiología del asma. El asma es una entidad de origen multifactorial en cuyo desarrollo intervienen factores ambientales (polvo, ácaros, etc.) y genéticos (genes de respuesta inmune, de remodelación de vías aéreas, etc.). Se propone que la interacción entre estos factores es inversamente proporcional.

colorantes artificiales, detergentes, etc), virales (virus sincicial respiratorio, virus de para-influenza, coronavirus, virus de la influenza y rinovirus), ejercicio y estrés emocional (Gern y cols., 1999).

#### **I.1.5B Factores intrínsecos**

Se sabe que la edad, el género y la raza, también influyen en la susceptibilidad a padecer asma. De hecho, en las dos primeras décadas de vida, el asma es más frecuente en hombres que en mujeres (2:1) y estudios de HRB mostraron que los niños tienen mayor respuesta a metacolina que las niñas, quienes presentan estos mismos niveles de respuesta sólo hasta que alcanzan la adolescencia (Postma, 2007). Además, se ha observado que tanto la incidencia como la prevalencia de HRB en mujeres en edad reproductiva son mayores que en hombres y la tasa de mortalidad por asma en población adulta es mayor en el género femenino (Zamel y cols., 1996). Aunque el impacto de las hormonas sexuales no está bien definido, algunos estudios sugieren que estas diferencias de género se deben a la participación de los estrógenos y la progesterona. Por otro lado, estudios poblacionales han documentado una mayor prevalencia del asma en hispanos que en las razas negra y caucásica, pero la gravedad de la enfermedad es mayor en la población de raza negra (Lester y cols., 2001), lo que sugiere que ambos, la prevalencia y la gravedad de la enfermedad se encuentran relacionadas a la etnicidad de las poblaciones.

#### **I.1.5C Factores genéticos**

El asma es una enfermedad muy compleja, sin un patrón de herencia definido y a diferencia de las entidades monogénicas, en donde un solo gen es el responsable de la enfermedad, en esta patología participan una gran variedad de genes en su etiología. Así mismo, se ha propuesto que variaciones en la secuencia de estos genes tienen una contribución diferencial en la enfermedad entre las poblaciones y aún entre los individuos (Fig. 4) (Contopoulos-Ioannidis y cols., 2007).

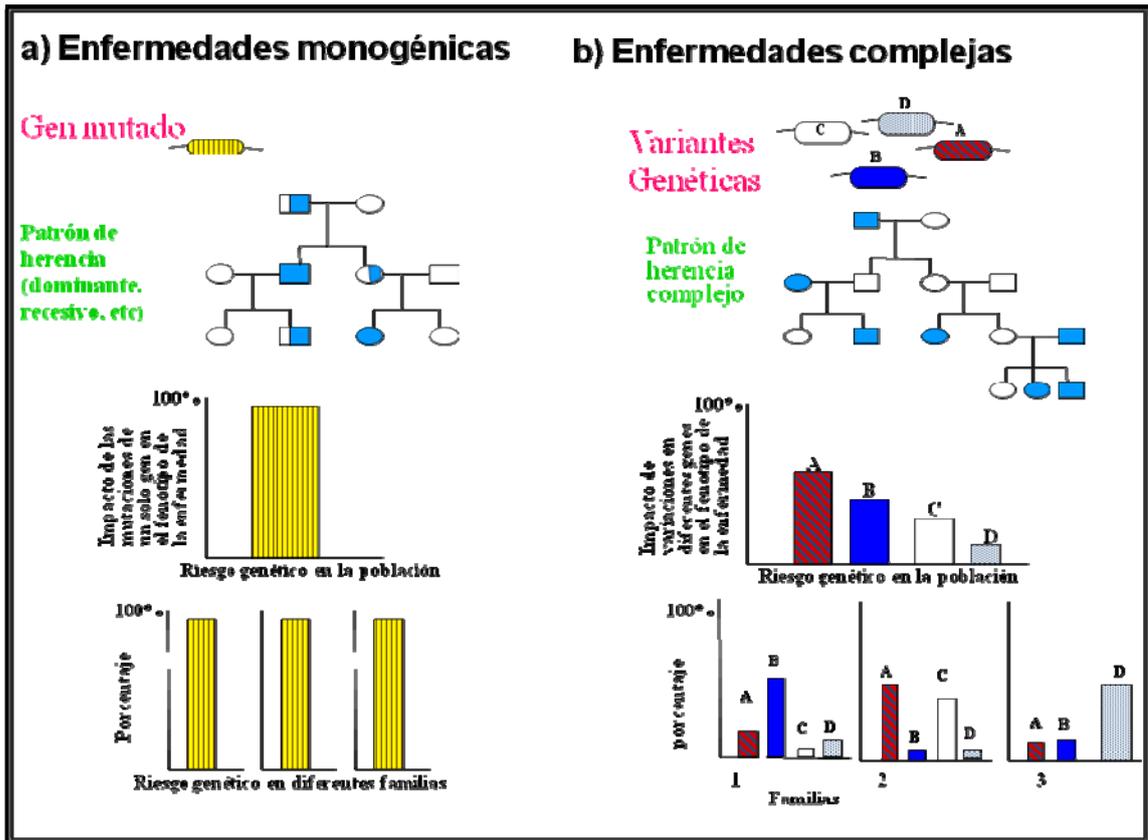


Fig. 4. Enfermedad monogénica vs enfermedad compleja. a) Un gen es el responsable de la enfermedad, se identifica un patrón de herencia, el riesgo para portadores de mutaciones en el gen es el mismo aún entre individuos de distintas poblaciones; b). Varios genes son responsables de la enfermedad, no hay un patrón de herencia definido, el riesgo genético es distinto entre cada individuo.

**a) Evidencias de la participación de los factores genéticos en asma**

Las primeras evidencias que propusieron la participación de los factores genéticos en el asma se derivaron principalmente de los estudios epidemiológicos realizados en familias y en gemelos.

*i) Estudios en familias*

Los estudios en familias comparan la frecuencia con la que individuos genéticamente relacionados con el paciente desarrollan la misma enfermedad y estiman el riesgo que tienen sus familiares de primer grado para padecerla (factor  $\lambda$ ). En el asma, estos estudios han mostrado que el riesgo de los familiares de primer grado de un paciente es 4-5 veces mayor (20-25 %) que en la población general (4-5 %) (Manian, 1997).

*ii) Estudios en gemelos*

Los estudios en gemelos han documentado que la concordancia del asma en gemelos monocigotos (MC), quienes comparten el 100% de su información genética, es mayor que en gemelos dicigotos (DC), los cuales comparten sólo el 50% de su genoma (36-79% vs 5-12, respectivamente). Asumiendo que tanto los hermanos MC como DC crecen en condiciones ambientales similares, la mayor concordancia observada en gemelos MC apoya la hipótesis de la participación de factores genéticos en la etiología del asma (Manian 1997).

**b) Estrategias para la identificación de genes en asma**

La identificación de los genes que influyen en el asma y sus fenotipos relacionados como alergia e HRB, se ha llevado a cabo principalmente mediante estudios de ligamiento y de asociación.

*i) Estudios de ligamiento*

Los estudios de ligamiento fueron de los primeros abordajes que se utilizaron para la identificación de genes responsables de una patología,

particularmente en enfermedades monogénicas. En estos, se analizan dos o más marcadores genéticos polimórficos y se evalúa su cosegregación con la enfermedad (marcadores heredados junto con la enfermedad) (Fig. 5) en familias con pedigríes extensos (Fig.5a) o pares de hermanos afectados (sib pair analysis) (Fig. 5b). En los estudios de ligamiento, la cosegregación de un marcador con la enfermedad podría ser indicador de que este marcador se encuentra dentro o aledaño al gen responsable de la patología o de la susceptibilidad a padecerla (Baca y Orozco, 2004). El primer estudio de ligamiento con fenotipos relacionados a asma fue publicado por Dasgupta y cols., (1977), quienes reportaron asociación entre los haplotipos HLA-A1-B8 y HLA-A9-B7 del complejo principal de histocompatibilidad (MHC o HLA) con atopia. Posteriormente, se identificó un locus en el cromosoma 11q13 ligado a asma, alergia y rinitis, donde la elevación de los niveles séricos de IgE se heredaba con un patrón de herencia dominante (Cookson y cols., 1989; Lympny y cols., 1992). Con base en estos estudios y considerando que el incremento de los niveles de IgE en suero es una característica del asma atópica y de la alergia, Meyers y cols., (1994) realizaron un análisis de marcadores localizados en el cromosoma 5q en familias con pares de hermanos afectados. Estos estudios aportaron una gran cantidad de evidencias de la relación de esta región con la regulación de la respuesta alérgica y por ende, con la patogénesis del asma. La importancia de 5q en esta patología y fenotipos relacionados radica en que en este locus se localizan una gran cantidad de genes que influyen en el control de los niveles de IgE e inflamación como las citocinas IL4, IL5, IL13, etc.

Aunque los estudios de ligamiento han aportado gran cantidad de información y permitido identificar genes nuevos ligados a una entidad, la dificultad inherente a la obtención de un gran número de familias con más de un individuo afectado, el patrón complejo de la herencia del asma y el efecto pequeño de cada factor genético involucrado en ella, han sido limitantes importantes para el uso de esta estrategia en la identificación de genes relacionados con la enfermedad.

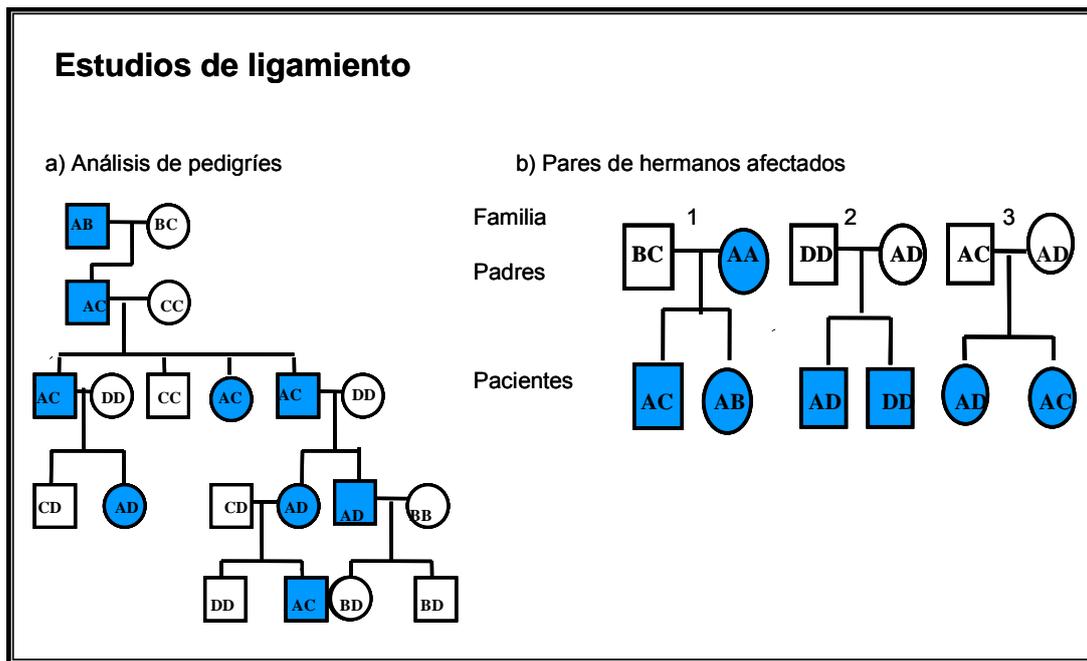


Fig. 5. Análisis de ligamiento. En ambos casos se evalúa la frecuencia con la que un marcador cosegrega con la entidad. Este marcador puede ser el responsable de la enfermedad o estar en cercanía física con el gen causal.

## *ii) Estudios de asociación*

Los estudios de asociación evalúan la co-ocurrencia de un marcador con la enfermedad en individuos no relacionados (Fig.6). Estos estudios son utilizados ampliamente en el abordaje de las entidades complejas porque son menos costosos, es más fácil obtener muestras de individuos no relacionados y se pueden detectar genes con un efecto pequeño en la enfermedad. En los estudios de asociación existen dos principales tipos de diseño: a) casos y controles y b) estudios basados en familias (tríos: padres y paciente).

### *Casos y controles*

Los estudios de casos y controles comparan las frecuencias de una variante alélica o polimorfismo específico entre el grupo de pacientes y la población de controles sanos (Fig. 6a). La predominancia o disminución del alelo en alguna de las poblaciones de estudio sugiere que esta variante se encuentra cercana al alelo involucrado con la enfermedad o asociada a ésta como factor de susceptibilidad, de protección o como modificador de la gravedad o de la respuesta al tratamiento. Sin embargo, aunque estos estudios han arrojado una gran cantidad de datos que han contribuido a identificar a los factores genéticos y por ende algunos mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de asma, la estrategia de casos y controles presenta ciertas limitaciones; dos de las más importantes y que conducen a establecer falsas asociaciones son: 1) la estratificación de la población, la cual puede deberse a que el muestreo de los casos o de los controles se realice en una región determinada (poblaciones con apareamiento no azaroso o endogámicas), por lo que la muestra puede no ser representativa de la población general y 2) el desequilibrio de ligamiento (LD, por sus siglas en inglés), el cual puede ser dado principalmente por una baja tasa de recombinación u origen reciente de las poblaciones. Una alternativa para eliminar estas desventajas es el análisis de marcadores de ancestría (AIMs, por sus siglas en inglés). Los AIMs permiten aparear el grupo de casos y controles de acuerdo con su origen étnico (Choudhry y cols., 2006).

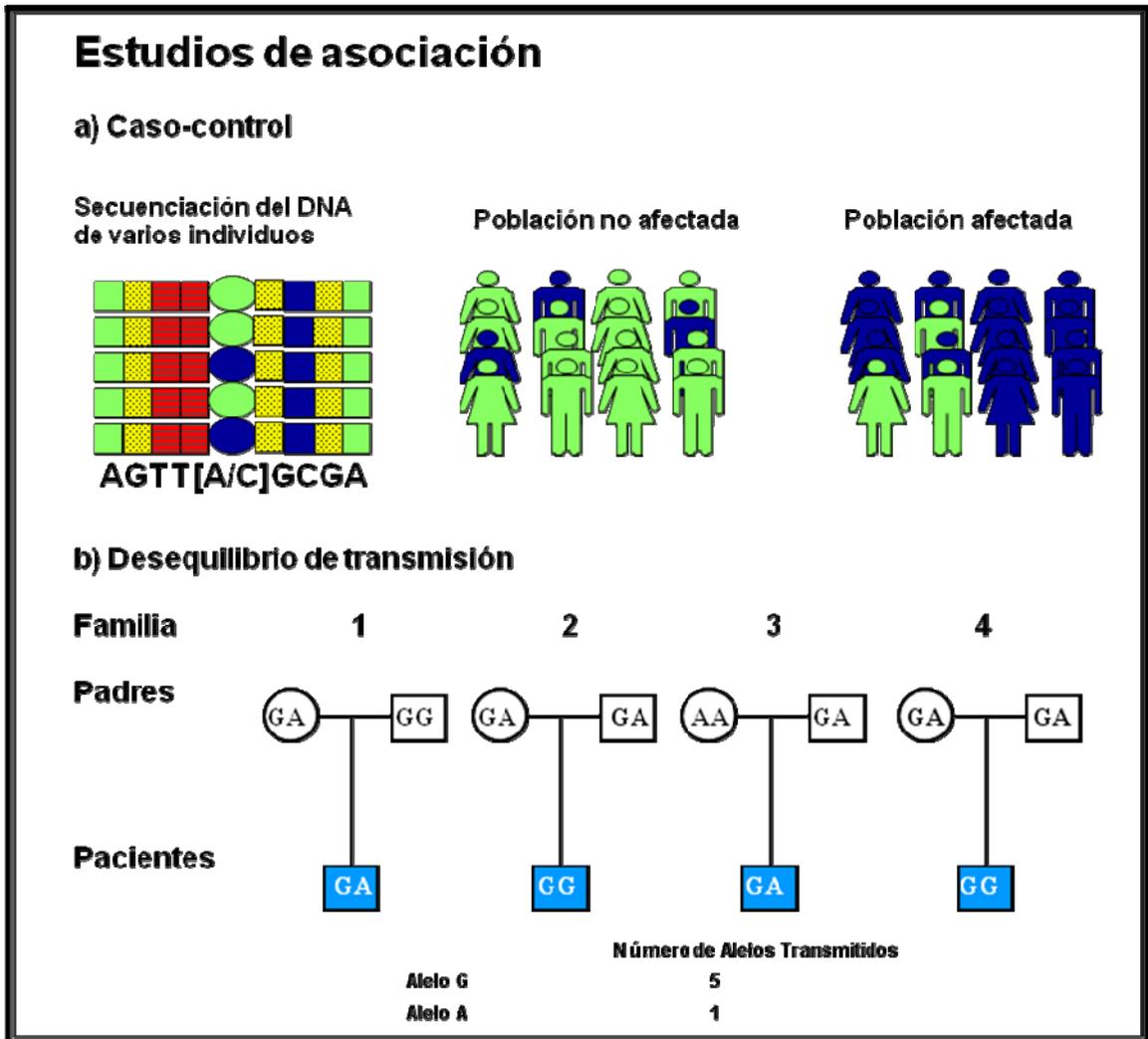


Fig. 6. Estudio de asociación. a) Compara las frecuencias del alelo de un polimorfismo entre casos y controles y b) compara la frecuencia con la que padres heterocigotos transmiten este alelo a su hijo enfermo.

Actualmente, se han identificado alrededor de 44 AIMs que resultan útiles para evaluar la estructura de la población en grupos de gran heterogeneidad genética como la mestiza mexicana, 10 de los cuales han sido validados en estudios de asociación de casos y controles en pacientes mexicanos con diabetes (Martínez-Marignac y cols., 2007; Villarreal-Molina y cols., 2007).

#### *Asociación basada en familias*

El análisis de la asociación basada en familias aplicando la prueba de desequilibrio de transmisión (TDT) es otra alternativa potencial para eliminar la posibilidad de falsas asociaciones por estratificación. Estos estudios se realizan en tríos, con el objeto de obtener tanto casos como controles dentro de la misma familia. La TDT determina la frecuencia con la que padres heterocigotos transmiten un marcador específico a sus hijos afectados. Asumiendo que cada marcador tiene la misma probabilidad de pasar a la siguiente generación (50%), cuando la transmisión de uno de ellos se observa con mayor frecuencia en el grupo de los casos, se sugiere que éste puede estar asociado a la enfermedad (Fig. 6b) (Baca y Orozco, 2004). Sin embargo, la principal limitante de esta estrategia es la disponibilidad del número de tríos que permita obtener un poder estadístico adecuado (>80%).

Con sus limitaciones, tanto los estudios de casos y controles como los análisis de tríos, se usan ampliamente para la identificación de los marcadores genéticos asociados al desarrollo y la gravedad del asma, principalmente en la búsqueda de SNPs en genes candidatos (Hoffjan y cols., 2003). Los SNPs son la fuente más común de variación genética en el ser humano, actualmente se han descrito alrededor de 11 millones de ellos y se estima que se puede encontrar un SNP por cada 0.3 a 0.5 kilobases (Kb) (Schork y cols., 2000). La mayoría de los SNPs son bialélicos (dos alternativas), tienen una baja tasa de mutación recurrente y son muy estables (Xion y Jin, 1999). Además, a diferencia de otros marcadores genéticos (microsatélites y minisatélites), los SNPs pueden ser analizados a gran escala en aparatos automatizados, por lo que tienen un alto

potencial en el mapeo genético de las enfermedades complejas.

### *iii) Estudios amplios del genoma*

El escaneo completo del genoma o genome wide scan (GWS, por sus siglas en inglés), es una estrategia que permite el análisis de cientos de polimorfismos a la vez o incluso miles de ellos (microarreglos), tanto en estudios con un diseño de casos y controles como de ligamiento (en familias) (Brasch-Andersen y cols., 2008; Denham y cols., 2008; Weidinger y cols., 2008; Terlink y cols., 2009) (Fig. 7). Los microarreglos más recientes (Affymetrix V 6.0) contienen sondas para analizar hasta 906,600 de SNPs y cerca de 950 variaciones en el número de copias (CNVs, por sus siglas en inglés). La genotipificación de más de 500 marcadores polimórficos generalmente es adecuada para detectar regiones ligadas a la enfermedad.

La técnica de microarreglos también puede utilizarse para estudiar el perfil de expresión de un gran número de genes, a partir del ADN complementario (cADN) obtenido directamente del RNA de casos y controles.

Así, los GWS de genotipificación o de expresión han sido útiles para evaluar las diferencias genéticas entre asma atópica y no atópica, la expresión de genes relacionados con la fisiopatología del asma tanto en humanos como en modelos animales y la respuesta al tratamiento con corticosteroides inhalados en humanos, entre otros. Los resultados obtenidos con los GWS muestran a las regiones cromosómicas 5q33, 11q13, 12q24, 16p13, 17q12 y 20p13 como las más consistentemente relacionadas al asma, alergia o HRB en varias poblaciones independientes. Estos, también han permitido identificar nuevas regiones cromosómicas ligadas a asma (2p12-q22.1, 3p22.1-q22.1, 5q11.2-q14.3, 6p22.3-p21.1, 11q24.1 y 17p12-q24.3, etc.) y nuevos genes candidato asociados a la entidad como: moléculas de adhesión celular, enzimas proteolíticas, enzimas antioxidantes, etc. (Denham y cols., 2008).

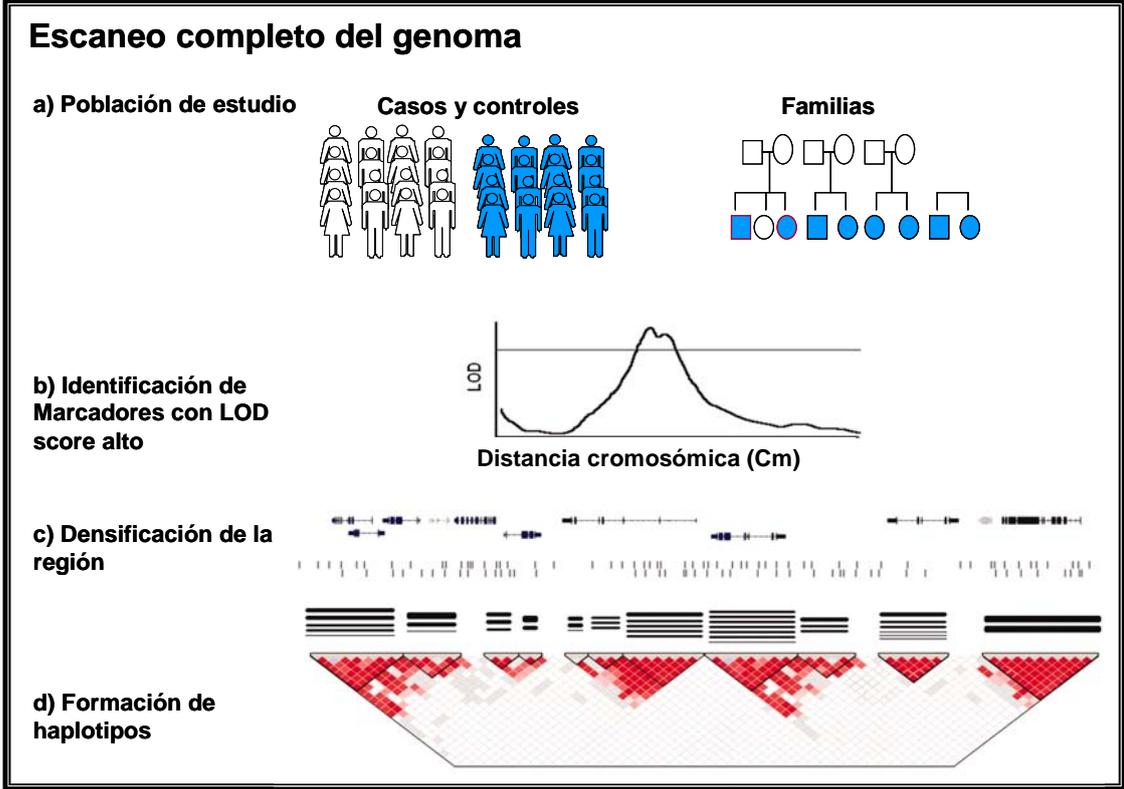


Fig. 7. Análisis amplio del genoma. a) Se analizan casos y controles o familias, b) se identifican las regiones cromosómicas que son flanqueadas por los marcadores con más nivel de ligamiento (LOD score > 3), c) se analizan más marcadores dentro de la región, d) se generan haplotipos para identificar SNPs etiqueta.

### c) Genes asociados a asma

La activación de diferentes tipos celulares (células B y T, eosinófilos, macrófagos) y moléculas (mediadores intracelulares, citocinas) en un espacio y tiempo dado (fase temprana, remodelación), reflejan la gran complejidad genética del asma (Malerba y Pignatti, 2004). Aunado a lo anterior y dado que muchos de los resultados derivados de los estudios de asociación no son fácilmente replicados entre las poblaciones, se sugiere que esta complejidad también está dada por una contribución genética diferencial intrínseca a cada población. Sin embargo, aún con estas limitaciones, a la fecha se han reportado más de 100 genes candidato en asma, de los cuales cerca de 25 de ellos muestran resultados consistentes en varias poblaciones. Estos incluyen genes que codifican para citocinas y sus receptores, receptores nucleares, receptores transmembranales, receptores acoplados a proteínas G, fosfatasa, transportadores, canales iónicos, factores de transcripción, enzimas, etc. (Bossé y Hudson, 2007). Dentro de éstos se encuentran: *IL4*, *IL13*, receptor  $\beta$  2-adrenérgico (*ADR $\beta$ 2*), *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1*, *TNF $\alpha$* , subunidad  $\beta$  del receptor Fc de alta afinidad a IgE (*FCER1 $\beta$* ), *IL4R*, metaloproteasa y desintegradora 33 (*ADAM33*), *IL10*, *STAT6*, receptor celular 1 del virus de la hepatitis A (*HAVCR1*), *RANTES*, filagrina (*FGL*), *IL17F*, antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (*CTLA4*), antígeno 14 de diferenciación de monocitos (*CD14*), glutatión S-transferasa T1 (*GSTT1*), glutatión S-transferasa P1 (*GSTP1*), entre otros (Bossé y Hudson, 2007; Vercelli, 2008) (Tabla 1).

La participación de cada uno de los genes candidato en la etiología del asma es principalmente a través de SNPs que modifican la actividad de la proteína o la expresión de los genes y que pueden afectar el desarrollo de la enfermedad, su evolución o el metabolismo de los fármacos administrados a los pacientes; por lo tanto, los polimorfismos pueden ser de susceptibilidad/protección, modificadores o de respuesta al tratamiento.

**Tabla 1. Genes que han mostrado evidencia de asociación con asma y fenotipos relacionados en varios estudios independientes.**

Gen	Loci	SNP	Función
<i>GSTM1</i>	1p13.3	+/null	Detoxificación de estrés oxidativo y ambiental
<i>FLG</i>	q21.3	Arg510X, 2282del4	Integridad de la barrera epitelial
<i>IL10</i>	1q31-q32	-1082A/G, -571C/A	Inmunoregulación
<i>CTLA4</i>	2q33	-318C/T, 49A/G	Inmunoregulación e inhibición de la respuesta de Cél-T
<i>CD14</i>	5q31.1	-1721G/A, -260C/T	Inmunidad innata y reconocimiento microbiano
<i>IL4</i>	5q31.1	-589C/T, +33C/T	Diferenciación de TH2 e inducción de IgE
<i>SPINK5</i>	5q32	-589C/T, +33C/T	Inhibidor epitelial de proteasas de serina
<i>ADRB2</i>	5q31-q32	Arg16Gly, Gln27Glu	Relajación del músculo liso
<i>HAVCR1</i>	5q33.2	5383_5397del	Regulación de respuesta de cél-T
<i>LTC4S</i>	5q35	-444A/C	Biosíntesis de cisteinil-leucotrieno e inflamación
<i>LTA</i>	6p21.3	NcoI (intrón 1)	Inflamación
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	6p21	-308 G/A, -238G/A	Inflamación
<i>HLA-DRB1</i> - <i>DQB1</i> - <i>DPB1</i>	6p21	Múltiples alelos	Presentación de antígenos
<i>GPRA</i>	7p14.3	Haplotipos	Regulación de crecimiento celular y mecanismos neurales
<i>FCER1B</i>	11q13	Ile181Leu, Gly237Glu	Receptor de IgE de alta afinidad
<i>CC16</i>	11q12.3	38A/G	Proteína antiinflamatoria derivada de epitelio
<i>GSTP1</i>	11q13	Ile105Val	Detoxificación de estrés oxidativo y ambiental
<i>IL18</i>	11q22.2	-656T/G, -137G/C	Inducción de IFN $\gamma$ y TNF
<i>STAT6</i>	12q13	2964G/A, (GT) $n$ exón 1	Señalización de IL4 e IL13
<i>NOS1</i>	12q24.2	3391C/T, 5266C/T	Síntesis de óxido nítrico y comunicación celular.
<i>IL4R<math>\alpha</math></i>	16p12.1	Arg551Gln, Ser727 Ala, Glu275Ala, Cys406Arg	Cadena $\alpha$ de los receptores de IL4 e IL13
<i>CCL11</i>	17q21.1	Ala23Thr, -1328G/A	Quimioatrayente de eosinófilos
<i>CCL5</i>	17q11.2	-403A/G, -28C/G	Quimiotrayente de eosinófilos, cél-T y monocitos
<i>TBXA2R</i>	19q13.1	924T/C, 795T/C	Inflamación y contracción del músculo liso
<i>TGFB1</i>	19q13.1	-509C/T	Proliferación celular e inmunoregulación
<i>ADAM33</i>	20p13	D1, F1, L1, S1-2, T1-2, V1-7	Interacción matriz-célula y célula-célula

Los polimorfismos de susceptibilidad confieren una predisposición genética para el asma a diferencia de los de protección, los cuales protegen o limitan el desarrollo la enfermedad (estos últimos no han sido reportados en asma). La mayoría de los polimorfismos de susceptibilidad se encuentran en genes que codifican para proteínas involucradas en los procesos inflamatorios; en la síntesis de IgE y en la respuesta inmune. Entre los más importantes están las citocinas *IL4*, *IL5*, *IL9*, *IL13* y sus receptores, *HLA* y *TNF $\alpha$*  (Manian, 1997; Vercelli, 2008; Zhang y cols., 2008).

Los polimorfismos modificadores, como su nombre lo indica, modifican el curso de la enfermedad y por lo tanto están relacionados con la gravedad de la misma. Los principales genes asignados a este grupo son el *ADRB2* y la metaloproteasa *ADAM33*.

Por su parte los polimorfismos asociados a respuesta al tratamiento se localizan en genes que codifican para proteínas que participan en el transporte y metabolismo de los fármacos. Dentro de este grupo se ubican a los genes *ADRB2*, *ALOX5* (5-lipoxigenasa), *LTCC4S* (leucotrieno sintetaza C4) y *GCCR* (receptor de glucocorticosteroides) (Fenech y Hall, 2002; Joos y Sandford, 2002).

A continuación se describen algunos de los genes candidato en asma.

#### i) Citocinas y sus receptores

Los genes de las citocinas, fueron los primeros factores genéticos de riesgo identificados en asma. Las citocinas modulan la respuesta atópica, 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. Dentro de éstas, está su participación en las reacciones inflamatorias dependientes de IgE (Fig. 2) (Moffatt, 2008; Vercelli, 2008; Zhang y cols., 2008).

Gen *IL4*. Esta interleucina, es una citocina clave en el desarrollo de la atopia y 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 adherencia de eosinófilos. El gen *IL4*, se localiza en el cromosoma 5q32.1-32 y a la fecha se han descrito algunos polimorfismos en la región promotora de este gen, asociados a niveles elevados de IgE y asma en algunas poblaciones (Vercelli, 2008). Aunque los resultados son controversiales, la variante -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; Noguchi y cols., 1998; Chiang y cols., 2007).

Gen *IL13*. El gen *IL13* juega un papel central como mediador de la inflamación alérgica. Experimentalmente se ha visto que induce varios de los síntomas asociados a asma, ya que en un mecanismo dependiente de IL4R, promueve la hiperreactividad inducida por alérgenos, daño de células epiteliales, hiperplasia de células globosas, hiperproducción de moco, eosinofilia, etc; (Gruning y cols., 1998; Wills-Karp y cols., 1998; Wood y cols., 2003; Vladich y cols., 2005). El gen *IL13* se localiza en el cromosoma 5q31 y en él se han descrito 46 SNPs de los cuales 1923C/T, 2044G/A, 2525G/A, 2580C/A, y 2749C/T se encuentran en fuerte LD (Liu y cols., 2003; Konstantinidis y cols., 2007). Los polimorfismos Gln110Arg (rs20541) y 2044G/A han mostrado asociación con el asma y eosinofilia; mientras que el SNP C-1112T (rs1800925) contribuye significativamente al desarrollo de HRB y asma (Heinzmann y cols., 2000; Howard y cols., 2002; He y cols., 2003). Se ha propuesto que la interacción entre los dos alelos -1112T y 110Arg contribuye a obtener niveles elevados de expresión de *IL13* y una proteína con mayor actividad. Además, se ha reportado que existe una interacción significativa entre polimorfismos en ambos genes. Por ejemplo, en individuos alemanes con un genotipo 478P en el gen *IL4R* y -1112T en *IL13*, tienen una alta probabilidad de desarrollar asma (OR: 4.87, p= 0.0004) (Howard y cols., 2002). Recientemente también se ha demostrado que polimorfismos en el gen *IL13* interactúan con polimorfismos en el gen *IL4* en el desarrollo del asma (Kabesch y cols., 2006).

*IL4R $\alpha$* . Este gen codifica para la cadena alfa del receptor de IL4, una proteína transmembranal que se une a IL4 e IL13 para regular la producción de IgE (Izuhara y Shirakawa, 1999). Se ha observado que ratones deficientes en *IL4R $\alpha$*  no son capaces de inducir reacciones inmunes mediadas por Th2, ni de promover la síntesis de IgE. Estos datos indican que *IL4R $\alpha$*  es un componente crucial para la unión y transducción de señales mediadas por IL4 e IL13. Aún cuando los resultados derivados de estudios del análisis de polimorfismos de *IL4R $\alpha$*  en pacientes asmáticos o atópicos muestran resultados diversos, en este gen se han identificado más de 6 SNPs asociados a estos fenotipos; sin embargo, I50V, S503P y Q576R han sido los más analizados y este último es el que ha mostrado resultados más consistentes en un mayor número de poblaciones (Deichmann y cols., 1998; Mujica-López y cols., 2002; Cui y cols., 2003; Vercelli, 2008).

*IL13R*. Este receptor está formado por dos subunidades; *IL13R $\alpha$ 1* e *IL13R $\alpha$ 2*, cuyos loci se encuentran en el cromosoma Xq13. La subunidad *IL13R $\alpha$ 1* se une débilmente a IL13, aunque puede formar un heterodímero con *IL4R $\alpha$*  y funcionar como un receptor tanto para IL4 como para IL13. En el gen *IL13R $\alpha$ 1* se han identificado por lo menos cinco polimorfismos (Ahmed y cols., 2000; Heinzmann y cols., 2000, Konstantinidis y cols., 2007), dos de los cuales han revelado asociación con asma y sus fenotipos relacionados en varias poblaciones (Ahmed y cols., 2000; Heinzmann y cols., 2000). El SNP 1365A/G, localizado en la región 3' no traducible del gen (UTR, por sus siglas en inglés), ha mostrado una asociación significativa con los niveles totales de IgE en suero en población británica (Heinzmann y cols., 2000), mientras que en población japonesa se reportó que el polimorfismo 1050C/T está asociado con asma atópica (Ahmed y cols., 2000). Ambos estudios, aportaron evidencia de desordenes atópicos ligados al cromosoma X. A la fecha no existen reportes de asociación entre polimorfismos en el gen *IL13R $\alpha$ 2* y asma o alergia.

*FceR1 $\beta$* . Este gen codifica para la cadena  $\beta$  del receptor de alta afinidad para IgE de los mastocitos y fue uno de los primeros genes investigados en asma. El gen *FceR1 $\beta$*  controla la activación de mastocitos y basófilos, participa en la presentación de antígenos mediada por IgE. Además su agregación permite la regulación de diversas respuestas efectoras incluyendo la secreción de mediadores alérgicos e induce la transcripción de citocinas como IL4, IL6, TNF $\alpha$  y GM-CSF (Donnadieu y cols., 2000). En el gen *FceR1 $\beta$*  se han descrito varios polimorfismos tanto en la región promotora como en la región codificante (Traherne y cols., 2003). Sin embargo, sólo algunos se han asociados a asma y sus fenotipos relacionados. Dos de ellos presentes como una doble mutación Ile181Leu y Leu183Val, se relacionan con un aumento en los niveles de IgE en suero, atopía y HRB, otro (E233G) se encontró asociado con HRB e hipersensibilidad cutánea (Shirakawa y cols., 1994; Hijazi y cols., 1998) y otro más, -109C/T se asoció a asma inducida por aspirina (Kim y cols., 2006).

ii) Complejo principal de histocompatibilidad o antígeno leucocitario humano *HLA*. Los genes del antígeno leucocitario humano o HLA, localizados en la región q11-22 del cromosoma 6, tienen un papel fundamental en la regulación del sistema inmune y otros procesos celulares (Shiina cols., 2004). El locus *HLA*, especialmente algunos alelos de genes clase II como HLA-DRB1, -DQA1 y -DQB1, se han identificado como importantes genes candidatos para asma en varios estudios independientes (Ober y cols., 1998; Wjst y cols., 1999; Moffatt y cols., 2001; Guo y cols., 2001). Estos genes, presentan una influencia ampliamente reconocida en la capacidad para responder a alérgenos específicos y se ha demostrado que alelos particulares de ellos también se asocian con hipersensibilidad de la piel a alérgenos ambientales (Daniels y cols., 1996).

Por otro lado, en un estudio que incluyó tres poblaciones, se identificó que un polimorfismo en el alelo HLA-G está asociado a la susceptibilidad para desarrollar asma y HRB (Nicolae y cols., 2005).

*TNF $\alpha$* . El gen *TNF $\alpha$* . se encuentra dentro del MHC clase III y tiene un papel central como un mediador de la respuesta inflamatoria y en la regulación de la respuesta inmune. Esta citocina también se ha involucrado en procesos biológicos como proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Aunque algunos estudios muestran resultados controversiales (Bayley y cols., 2004; Shin y cols., 2004), un gran número de reportes, incluyendo un estudio realizado en población mexicana, muestran que el polimorfismo localizado en la región promotora de este gen -308G/A (rs1800629) se encuentra asociado con asma (Witte y cols., 2002; Shin y cols., 2004; Wu y cols., 2007). Un dato interesante del estudio de pacientes mexicanos con asma, es que el SNP -238G/A también es un factor de riesgo genético para desarrollar esta entidad en niños de padres fumadores (Wu y cols., 2007).

### iii) Factores de transcripción

*STAT*. Los factores activadores de transcripción y transductores de señales comprenden una familia de 7 proteínas (1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6) de 750 a 900 aminoácidos. En células quiescentes, las proteínas STATs se mantienen en su forma no activa, sin embargo después de la interacción con sus ligandos, las STATs son fosforiladas, forman heterodímeros y se translocan al núcleo para inducir la expresión de algunos genes. Existen evidencias experimentales que sugieren a los genes *STAT1*, *STAT4* y *STAT6* como candidatos para asma. De hecho un análisis de polimorfismos en el gen *STAT1* documentó asociación entre el SNP rs3771300 y atopia en población alemana (Pinto y cols., 2007). También se ha reportado asociación entre SNPs y haplotipos localizados en el gen *STAT6* con fenotipos relacionados a asma (atopia y niveles de IgE en suero), aunque estos hallazgos no se han replicado en otras poblaciones (Pykäläinen y cols., 2005; Schedel y cols., 2004).

#### iv) Metaloproteasas

*ADAM33*. La desintegradora y metaloproteasa 33, se ha descrito como el principal gen modificador en asma. Este gen se encuentra involucrado principalmente en la patogénesis de la HRB y la remodelación de la pared de las VA. *ADAM33* se localiza en el cromosoma 20p13 y su relación con asma lo establecieron van Eerdewegh y cols. (2002). En un estudio de casos y controles, estos autores identificaron 14 SNPs fuertemente asociados a asma, cinco de los cuales mantuvieron los resultados de asociación después de un análisis de TDT. Sin embargo, en otro estudio que incluyó pacientes mexicanos y puertorriqueños no se encontró ninguna correlación entre estos SNPs y asma; es probable que esta falta de reproducibilidad en los hallazgos sean reflejo de la variabilidad genética inter e intra poblacional, pero también existe la probabilidad de que tales diferencias sean por cuestiones metodológicas.

*MMP*. Las metaloproteasas (MMPs) pertenecen a la familia de enzimas extracelulares dependientes de Zinc (Parks y Shapiro, 2001). Estas enzimas, cuyas funciones principales son la degradación de la matriz extracelular, modulación proteolítica de proteínas biológicamente activas y la migración celular, son secretadas por células inflamatorias y no inflamatorias (Goetzl y cols., 1996; Parks y Shapiro, 2001; Kheradmand y cols., 2002). Las MMPs se han involucrado en distintos desordenes inflamatorios de las VA, así como en enfermedades pulmonares graves; por ejemplo, se ha reportado que MMP9 (gelatinasa B) y ADAM8 están sobreexpresadas en pacientes con asma y fibrosis pulmonar idiopática (Cataldo y cols., 2000; Parks y Shapiro, 2001). Los análisis de asociación entre polimorfismos en estos genes y asma son escasos y los resultados controversiales (Ganter y cols 2005; Nakashima y cols., 2006). Ganter y cols., (2005) estudiando al los polimorfismos -1702T/A, -1562C/T, R279Q y 6C/T del gen *MMP9* en niños alemanes con asma, no documentaron asociación; mientras que Nakashima y cols., (2006) si reportaron asociación entre los SNPs -1590C/T y 2127G/T con susceptibilidad a esta enfermedad en población japonesa.

#### v) Receptores de broncodilatadores y broncoconstrictores

Las VA están inervadas por el sistema simpático y parasimpático, lo cual implica la activación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos y muscarínicos respectivamente. Ambos receptores, están acoplados a proteínas G y tienen muchas similitudes en sus mecanismos de acción. Por ejemplo, los receptores muscarínicos tipo 2 están unidos a proteínas G inhibitoras ( $G_i/o$ ) y que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos están ligados a proteínas G estimuladoras ( $G_s$ ). Además, la expresión de un receptor puede ser modulado por la actividad del otro, como se ha visto en células embrionarias de pulmón humano, donde la estimulación con agonistas de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos induce una disminución en la expresión celular del receptor muscarínico 2 (Rousel y cols., 1996; Proskocil y cols., 2005).

ADR $\beta_2$ . De los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, el gen ADR $\beta_2$  (5q31-32) ha sido el más investigado en estudios genéticos del asma. Aunque la mayor parte de ellos han mostrado que la asociación entre los polimorfismos en este gen y la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad es muy débil o no existe (Dewar y cols., 1998), se ha observado una asociación importante con la respuesta al tratamiento y con la gravedad de la misma (Hoffjan y cols., 2003). Cuatro de nueve polimorfismos reportados para este gen resultan en sustituciones de aminoácidos en las posiciones 16, 27, 34 y 164, que con excepción del 34, todos alteran la función del receptor (Liggett, 1997). Al parecer, estos polimorfismos funcionales modifican el fenotipo de la enfermedad; por ejemplo, los pacientes homocigotos para el polimorfismo Gly16 presentan síntomas nocturnos con mayor frecuencia, tienen mayor reactividad de las vías respiratorias a histamina y muestran una respuesta pobre a la terapia con  $\beta$  agonistas, por lo que requieren del uso de corticoesteroides e inmunoterapia (Turki y cols., 1995; Liggett, 1997; Dewar y cols., 1998). En un meta-análisis publicado por Contopoulos-Ioannidis y cols., (2007) se confirmó la asociación entre el polimorfismo Gly16 y asma nocturna pero no con HRB. Otros estudios encontraron evidencias de asociación entre

polimorfismos en este gen y la respuesta a salmeterol y albuterol (Yancey y cols., 2009).

*CHRM*. Los receptores de acetilcolina tipo muscarínicos (*CHRM*, por sus siglas en inglés) son 5 (*CHRM1-5*) y están ampliamente distribuidos en las neuronas que inervan las VA. Los *CHRM* son activados por acetilcolina y el *CHRM2* es el regulador de la liberación de ésta, funcionando como un autoreceptor. La acetilcolina causa broncoconstricción, hipersecreción de moco y edema en las VA. Existen muchas evidencias experimentales que señalan a estos receptores como factores importantes en la patogénesis del asma, particularmente al *CHRM2* y *CHRM3* (Fisher y cols., 2004; Kanazawa y cols., 2006). Por ejemplo, Fisher y cols (2004) observaron que ratones knockout *M2-/-* desarrollaban una mayor respuesta broncoconstrictora ante un estímulo con acetilcolina, mientras que esta respuesta es nula en ratones deficientes de *chrm3* (*M3-/-*). Sin embargo hasta el momento sólo un reporte en población japonesa sugiere que polimorfismos en el gen *CHRM1* confieren susceptibilidad para desarrollar asma (Maeda y cols., 2006).

#### vi) Otros genes asociados al asma

En menos de 10 años el número de genes candidato en asma se ha incrementado enormemente y aunque de algunos de estos nuevos genes aún no se conoce su función, se han asociado a asma y atopia en más de dos estudios independientes. Ejemplo de ello son los genes *PHF11* (del Inglés “plant homeodomain zinc finger protein 11”), *DPP10* (dipeptidil peptidasa 10) y *GPR4* (gen del receptor de susceptibilidad para asma acoplado a proteína G) (Allen y cols., 2003; Zhang y cols., 2003; Laitinen y cols., 2004; Hersh y cols., 2007).

EL gen *PHF11* se localiza en el cromosoma 13q14 y las predicciones en su estructura sugieren que está involucrado en la regulación transcripcional. Además, se propone que la proteína *PHF11* tiene una participación importante en el aumento de los niveles de IgE y la gravedad del asma (Zhang y cols., 2003).

*DPP10* codifica para la dipeptidil peptidasa (DPP) 10 homóloga a DPP4, una

enzima que juega un papel central en el procesamiento de la quimiocinas como parte del sistema inmune innato y probablemente modula la respuesta inflamatoria en las VA de pacientes asmáticos (Laitinen y cols., 2004; Gao y Huang, 2004).

En lo que respecta al gen *GPRA*, éste se localiza en 7p, presenta dos isoformas que se expresan de manera diferencial entre los tejidos y se ha observado que la isoforma B es más común en células epiteliales y células del músculo liso de las VA de los pacientes asmáticos que en los controles sanos. Los estudios en población canadiense y finlandesa han mostrado que polimorfismos en este gen se asocian con niveles de IgE en suero y asma (Laitinen y cols., 2004). Cabe mencionar que en un estudio de pacientes mexicanos con asma en donde se analizaron 27 SNPs localizados en este gen, no se replicaron los resultados reportados en otras poblaciones (Wu y cols., 2008).

El constante crecimiento tecnológico en el diseño de técnicas más eficientes y menos costosas para la genotipificación de un gran número de individuos y el desarrollo de herramientas más poderosas para el análisis de la gran cantidad de datos derivados de estos estudios, están incrementando considerablemente el conocimiento del componente genético del asma. Sin embargo, la identificación de todos los genes involucrados en su etiología, la caracterización de las variantes genéticas que contribuyen a la etiopatogénia de la enfermedad en cada población, la replicación de los hallazgos de asociación entre diversas poblaciones y la comprensión de como los genes interactúan entre sí o con el ambiente, son metas que deben de ser alcanzadas para entender mejor la complejidad genética de esta entidad.

## II. JUSTIFICACIÓN

El asma es la enfermedad crónica más común en la infancia, de hecho es una de las principales causas de hospitalización de niños en México, lo que aunado al alto costo de su tratamiento, hacen de ella, un serio problema de salud pública. Actualmente, se han identificado SNPs en más de 100 genes candidato que confieren riesgo a asma, modifican su gravedad o modulan la respuesta al tratamiento. Los análisis genéticos realizados en diferentes poblaciones han revelado que las diferencias en la contribución de cada SNP entre grupos étnicos y entre individuos de una sola población, explican la heterogeneidad inter e intra poblacional en el riesgo a padecerla. Así, el descubrimiento de factores genéticos asociados a asma y aquellos que son propios de cada población podrían tener un gran impacto en el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico y de tratamiento. Un conocimiento invaluable en el área de la Medicina Genómica, cuyo objetivo es aplicar esta información al desarrollo de una medicina más preventiva, eficaz e individualizada, que permita incrementar y mejorar la calidad de vida del paciente.

Por otro lado, las evidencias sugieren una relación proporcional entre el número de alelos de riesgo genético y la edad de inicio de una entidad compleja, por lo que es posible que en el paciente pediátrico el componente genético de riesgo sea mayor que en el adulto. Así, la población pediátrica es ideal para el estudio de los factores genéticos implicados en el desarrollo de asma. Además, en esta población es más factible realizar estudios de asociación basados en familias (TDT), lo que permite validar los resultados encontrados en casos y controles.

Sin duda, una de las mejores vías para incrementar el conocimiento de la patogénesis del asma y mejorar las estrategias de diagnóstico y tratamiento, es la identificación de los genes y sus variantes alélicas asociadas a ella en la población mexicana, lo cual tiene una aplicación potencial en el cuidado del paciente y podría contribuir a disminuir el alto costo social y económico de esta entidad.

### **III. HIPÓTESIS**

Variantes alélicas de genes implicados en la respuesta inmune e inflamatoria confieren riesgo para desarrollar asma en la población infantil mexicana y son distintos a los reportados en otras poblaciones.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **IV.1 OBJETIVO GENERAL**

Identificar genes que participan en la etiopatogenia del asma en población pediátrica mexicana.

#### **IV.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar si SNPs localizados en genes asociados con asma en otras poblaciones confieren susceptibilidad o protección a padecer esta enfermedad en niños mexicanos.
2. Identificar nuevos SNPs en genes candidato.
3. Identificar haplotipos de riesgo o protección para padecer asma.
4. Identificar el modelo (aditivo, dominante o recesivo) en que los alelos de riesgo o protección identificados contribuyen al desarrollo del asma en la población mestizo mexicana.
6. Conocer si la frecuencia de los SNPs analizados en una muestra de individuos mexicanos sanos es similar a los descritos en otras poblaciones.

## **V. METODOLOGÍA**

### **V.1 TIPO DE ESTUDIO**

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

### **V.2 ESTRATEGIA GENERAL**

En este estudio se incluyeron un grupo de 150 casos diagnosticados con asma y un grupo de 450 controles que aceptaron firmar la carta de consentimiento informado. A todos ellos se les tomó una muestra de sangre periférica a partir del cual se realizó la extracción del ADN. Se evaluó la integridad y concentración de cada muestra de ADN y posteriormente todas las muestras se sometieron al análisis de discriminación alélica para 17 SNPs utilizando sondas TaqMan.

#### **V.2.1 Población de estudio**

Como controles se incluyeron individuos sanos no relacionados, pareados por origen étnico y género, sin antecedentes personales de asma o atopia; todos ellos fueron obtenidos del banco de sangre del INP. Dado que el genotipo evaluado no es dependiente de la edad, los controles fueron mayores de 18 años para disminuir la probabilidad de seleccionar individuos con susceptibilidad a padecer asma u otra entidad atópica. Todos los pacientes y controles nacieron en México, al igual que sus padres, abuelos y bisabuelos (mexicanos-mestizos).

Se excluyeron a los pacientes y los controles con antecedentes de ascendencia extranjera. También se excluyeron aquellos casos con asma y otra

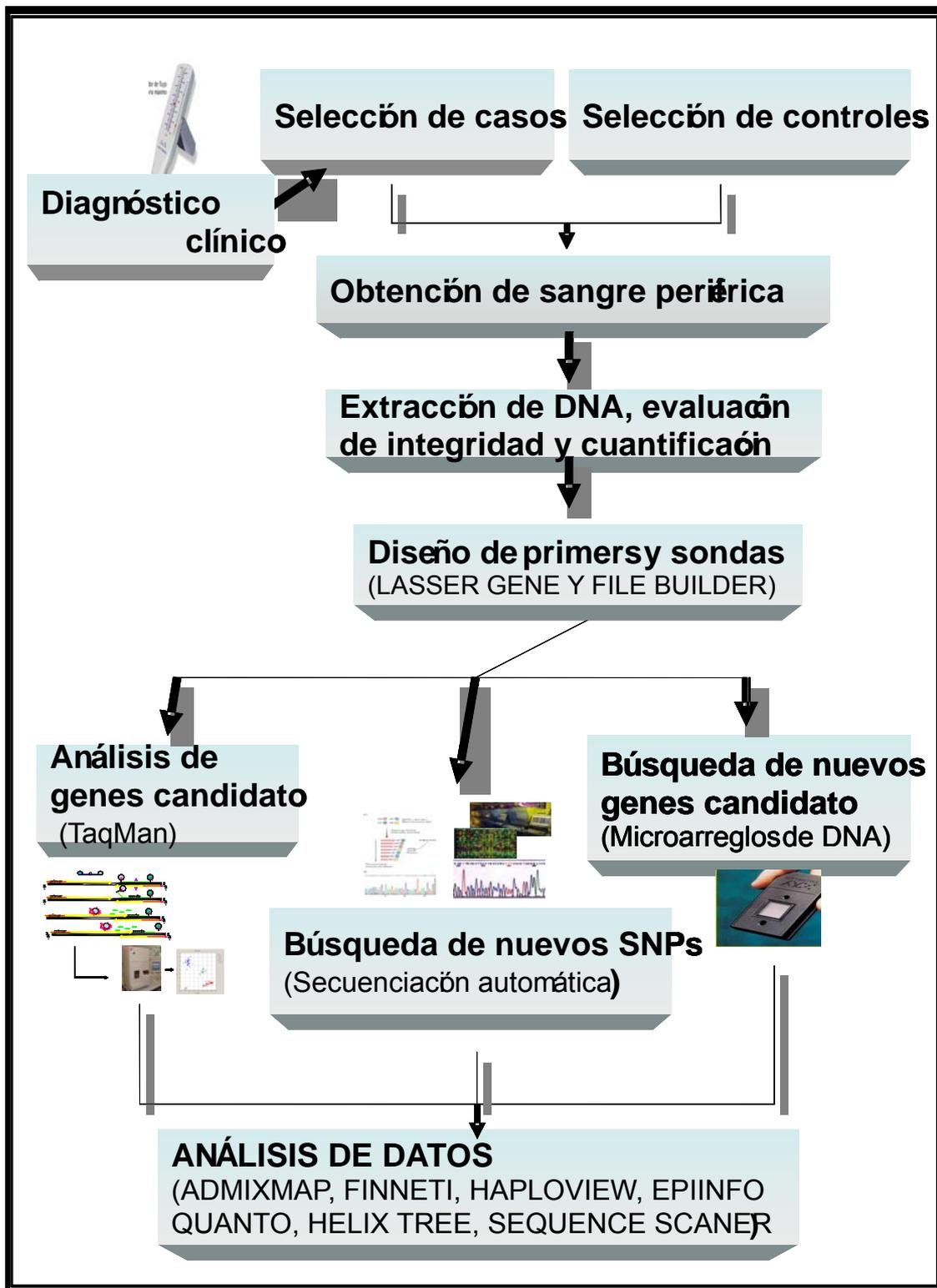


Fig. 8. Estrategia general.

enfermedad crónica concomitante (Fibrosis Quística, Tuberculosis, etc). Por razones de seguridad, se excluyeron a todos los pacientes o controles con enfermedades infectocontagiosas como SIDA o hepatitis. Se eliminaron del estudio a los pacientes y controles cuyo ADN no cumplió los criterios de integridad y pureza para su análisis.

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó mediante el programa QUANTO (<http://hydra.usc.edu/GxE>), asumiendo un modelo de riesgo aditivo y tomándose en consideración lo siguiente: 1) los valores previamente reportados de las frecuencias alélicas de los SNPs (0.01-0.3), 2) la prevalencia de la enfermedad en la población (10%), 3) un poder estadístico mínimo del 80% con un nivel de significancia estadística de 0.05 y una hipótesis alternativa de 2-colas, 4) un rango de valores de riesgo relativo o razón de momios (OR) de 1.3 a 3.0, el cual abarcaba los valores descritos para los SNPs que se incluyeron en el estudio y 5) un límite de confianza del 95% (1-alfa= 95%).

El estudio contó con la aprobación de los comités de ética de las Instituciones participantes. Las muestras de sangre periférica fueron tomadas después de que se contó con la carta de consentimiento informado firmada por los padres o tutores y con el asentimiento de los pacientes.

## **V.2.2 Análisis Genético**

El análisis genético consistió en genotipificación de SNPs localizados en 4 genes candidato.

### **V.2.2A Extracción de ADN a partir de sangre periférica**

De cada participante se obtuvieron 5 a 10 ml de sangre periférica mediante venopunción. La muestra de sangre se almacenó en tubos Vacutainer con EDTA para evitar su coagulación. Las células nucleadas se obtuvieron a partir de la centrifugación de 5 ml de sangre total a 3,000 rpm durante 20 min. Posteriormente la interfase compuesta por leucocitos se transfirió a un tubo limpio y las células se lavaron con 6 ml de solución de lisis de eritrocitos (RCLB).

Para la extracción de ADN, se utilizaron alternativamente dos Kits, QIAGEN

Blood (QIAGEN, GmbH D-40724, Hilden) y PUREGENE (GENTRA), bajo las especificaciones establecidas por los proveedores. Se adicionaron 3 ml de solución de lisis celular al tubo que contenía 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 el vortex durante 1 min y se centrifugó la muestra a 3,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un tubo limpio, al cual se le agregó 5 ml de isopropanol para precipitar el ADN. Las hebras de ADN se hicieron evidentes después de que se agitó el tubo fue por inversión por lo menos 6 veces. Finalmente con una pipeta Pasteur se extrajo el ADN y se diluyó en 500 ul de buffer TE (TEKNOVA).

#### **V.2.2B *Cuantificación y evaluación de la integridad del ADN***

La cuantificación del ADN se realizó en un espectrofotómetro (nanodrop) a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 260 nm. El sistema arrojó la concentración en ng/ul, tomando en cuenta el valor de D0260 (densidad óptica a 260 nm) y la constante para ADN (0.05). Los índices de pureza y de proteínas también se determinaron automáticamente. Un valor mayor a 1.6 indicó un nivel de pureza del ADN adecuado para estudios posteriores.

La evaluación de integridad del ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. En el gel se cargó 1 ul de ADN con 5 ul 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 ADN se consideró adecuada cuando su peso molecular fue mayor a 23,000 pares de bases (pb) (Fig. 9).

#### **V.2.2C *Análisis de genes candidatos***

En este análisis se incluyeron 23 distribuidos en 4 genes candidato, tales como: STAT1, STAT3, STAT4 Y STAT6, los cuales codifican para proteínas

involucradas en la regulación de procesos inmunes e inflamatorios, en la contracción del músculo liso y en la remodelación de las VA.

a) Diseño de oligonucleótidos y sondas específicas

Los oligonucleótidos para los análisis de secuenciación y las sondas de cada uno de los SNPs fueron diseñadas obteniendo la secuencia de cada gen del “Gene Bank” (NCBI) y utilizando los programas Primer Express 3.0 y File Builder v3.0 (Applied Biosystem Foster City, CA, USA), respectivamente.

b) Método fluorescente de 5' exonucleasa (TaqMan)

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 contenían en el extremo 3' un “quencher” (TAMRA) el cual mientras la sonda permanece intacta, inhibe la emisión de fluorescencia. Durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los primers hibridan con una secuencia específica del templado de ADN. Si éste contiene la secuencia polimórfica, la sonda TaqMan también hibrida con su secuencia homóloga. Durante la PCR, la AmpliTaq Gold, que tiene actividad tanto de ADN polimerasa como de exonucleasa 5'-3', es capaz de digerir la sonda marcada durante la amplificación y liberar el colorante fluorescente de la acción del “quencher”, de tal manera que dadas las condiciones de astringencia utilizadas durante la reacción, sólo la sonda específica para el polimorfismo presente es capaz de hibridar. Por lo tanto fue posible diferenciar un alelo del otro con base en el tipo de fluorescencia emitida (Fig. 10).

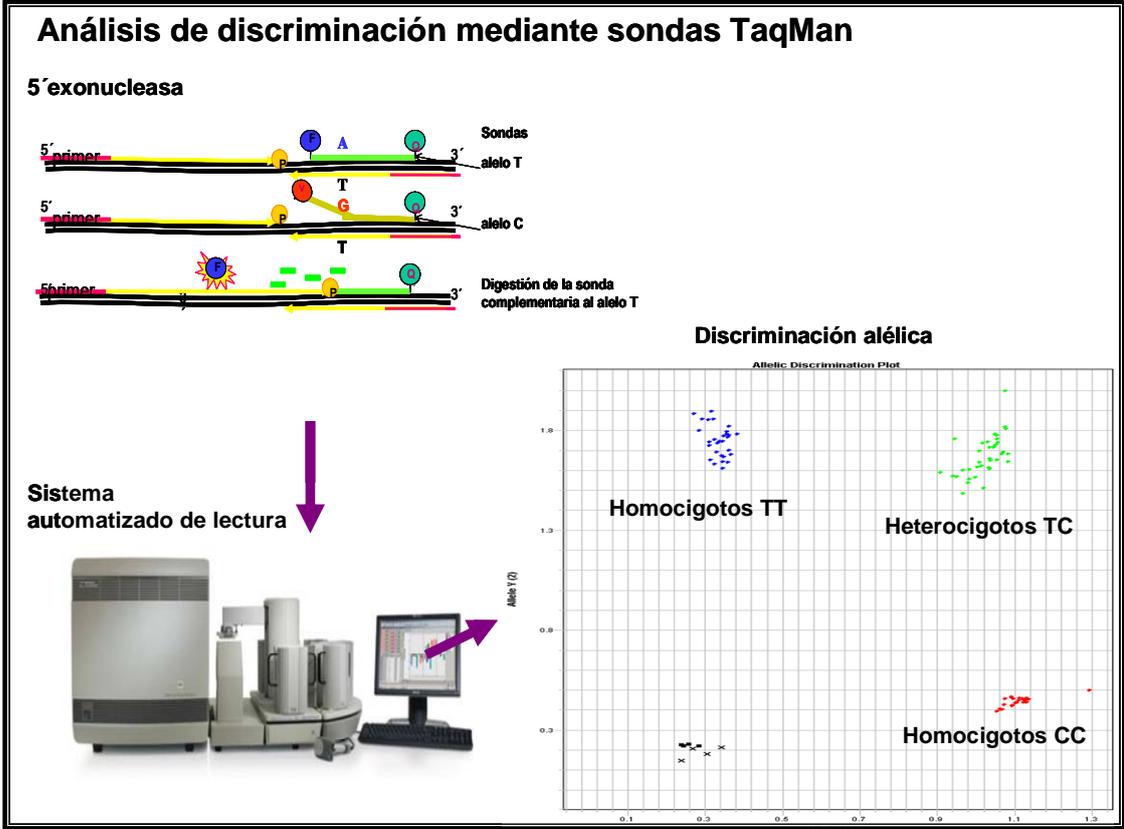


Fig. 10. Análisis de TaqMan. a) La polimerasa (p) digiere la sonda que es 100% complementaria al ADN blanco, de esta forma el fluorocromo que la identifica (F o V) emite fluorescencia, la cual es detectada en un sistema automatizado (b). Por las diferencias en la longitud de onda entre F o V, se pueden conocer el genotipo de cada individuo (c).

USA) en un volumen final de 25ml. El programa de PCR consistió de 1 ciclo a 95°C durante 10 min, 30 ciclos de 20 seg a 95°C, 20 seg a 62°C y 30 seg a 72°C y un ciclo final de 7 min a 72°C. Posteriormente, los productos de PCR se sometieron a digestión con 5U de enzimas *MspA1*, *RsaI* y *Tru9*, los cuales permitieron la discriminación de los polimorfismos Arg16Gly, Gln27Glu e Ile50Val respectivamente a una temperatura de incubación de 37°C durante 12 hrs. Posteriormente, se realizó una electroforesis con los productos de la digestión mezclados con 5 ml de colorante acarreador y un marcador de pesos en geles de poliacrilamida al 15% durante 90 min a 120 V. Después de que el corrimiento finalizó, el gel se sumergió en una solución al 15% de bromuro de etidio por espacio de 10 min. Finalmente, se realizó la visualización de los productos derivados de la restricción y el registro fotográfico en un fotodocumentador (Upland, CA. USA).

### **V.2.3 Análisis de resultados e interpretación de datos**

La asignación alélica tanto de casos y controles se realizó a partir del programa SDS implementada en el sistema de PCR en tiempo real 7900 HT Fast (Applied Biosystem Foster City, CA, USA). Mediante la prueba de X2 incluida en el programa Epi Info v. 6.02 (CDC Atlanta USA), se determinó la significancia estadística de las diferencias observadas entre casos y controles en la distribución de genotipos y alelos. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados como significativos. La evaluación de equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE, por sus siglas en inglés) se realizó a través del programa FINNETI (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1>). Los haplotipos se construyeron con el programa HAPLOVIEW 3.32 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/contact.php>) y la evaluación de estructura de la población se realizó con los programas STRUCTURE, STRAT y ADMIXMAP (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html> y <http://homepages.ed.ac.uk/pmckeigu/admixmap/index.html>). El programa ADMIXMAP también fue utilizado para ajustar los datos de asociación simulando 2 poblaciones.

## VI. RESULTADOS

### VI.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se estudiaron un total de 150 pacientes no relacionados con diagnóstico clínico de asma antes de los 17 años de edad. De estos 65% fueron masculinos y 35% femeninos, con una edad promedio de 11.5 años (sd  $\pm$ 3.3). La población control estuvo conformada por 450 individuos sanos: 250 (55%) masculinos y 200 (45%) femeninos.

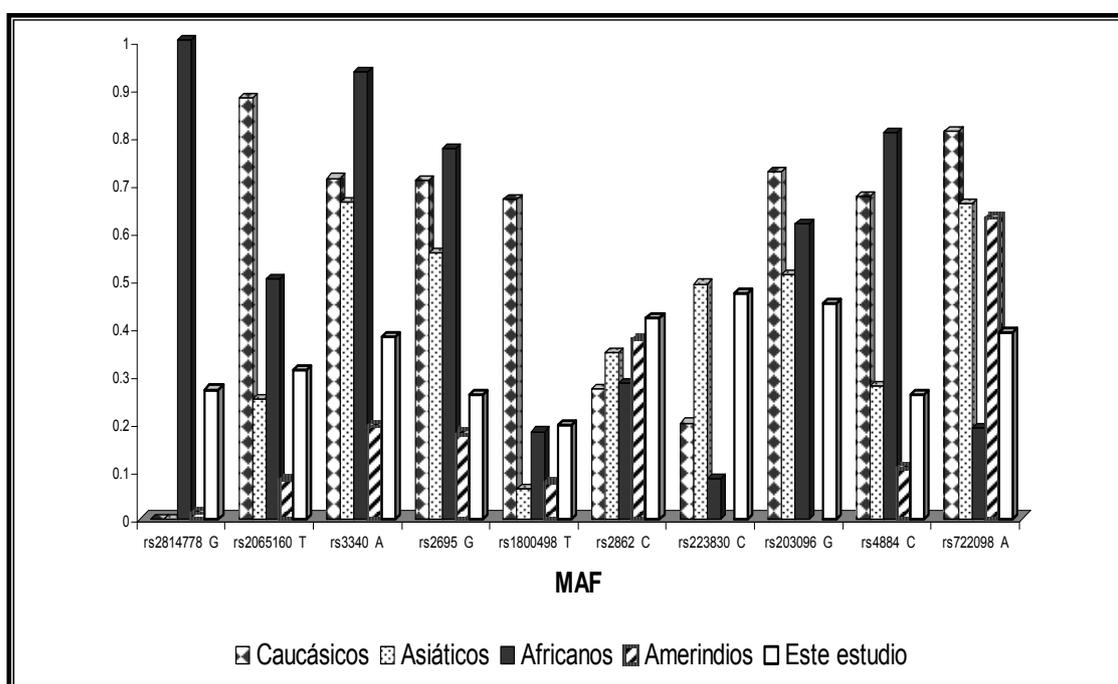


Fig. 13. Análisis comparativo en la distribución de AIMs entre poblaciones reportadas en el HAPMAP y la mestiza mexicana analizada en este estudio.

**Tabla 3. Genes y polimorfismos que no mostraron asociación con susceptibilidad a padecer asma.**

Gen	SNP	Alelo menor	Frecuencia del alelo menor		P
			Controles	Casos	
<i>STAT4</i>	rs30248866	T	15.4	12.7	0.6912
	rs3024898	A	3.2	2.6	0.4093
<i>STAT6</i>	rs3001428	C	1.1	0.3	0.1635
	rs2598483	T	5.1	6.7	0.1635
	rs4559	A	40.9	38.4	0.4400
	rs1059513	G	5.9	8.0	0.1947
	rs3024974	T	8.7	6.9	0.2925
	rs324011	C	5.1	6.7	0.2892
<i>DDIT4</i>	rs2052704	C	11.8	15.00	0.00
	rs4149570	A	32.6	30.2	0.38
<i>TNFR1</i>	rs767455	C	30.5	27.0	0.18
	rs2234679	G	5.4	6.4	0.46

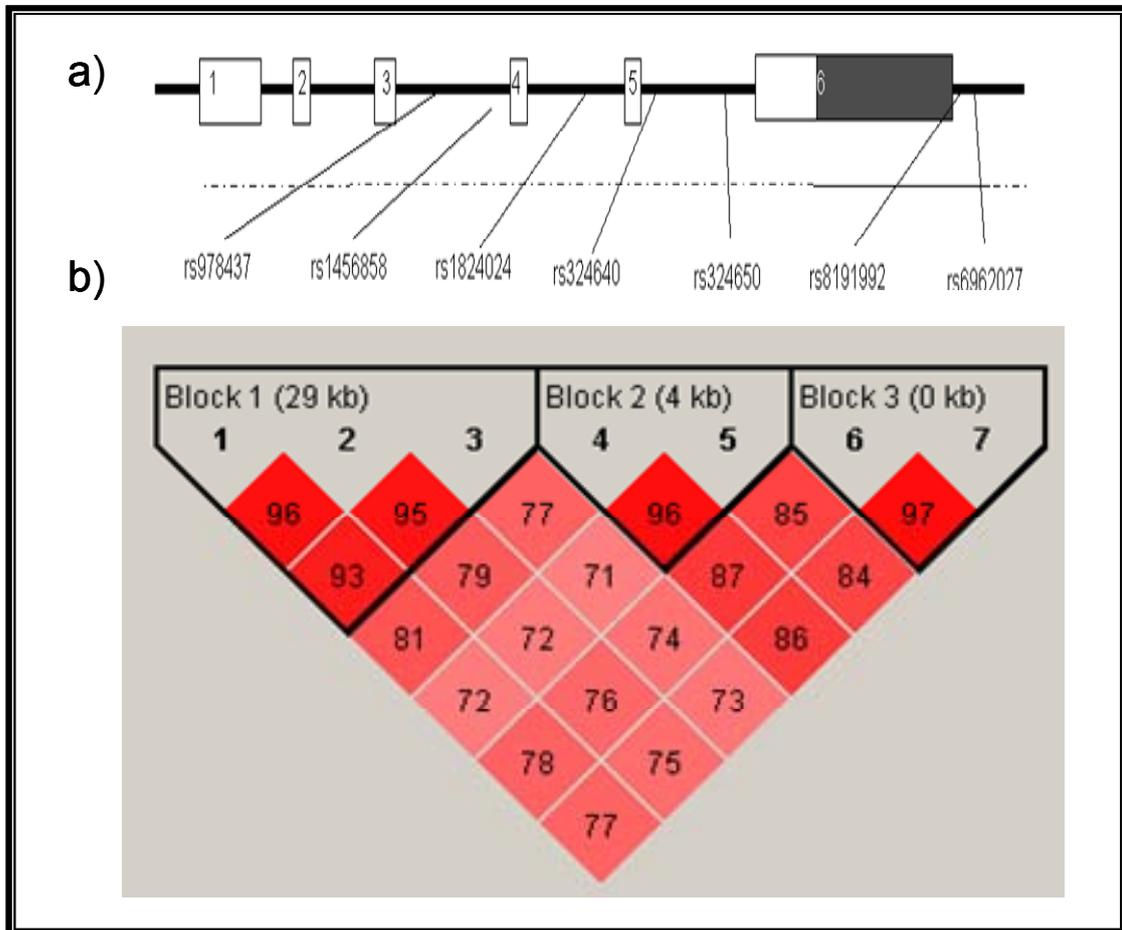


Fig. 14. Gen *CHRM2*. a) Estructura del gen y localización de SNPs incluidos es este estudio. Los exones son representados por cuadros, los cuadros blancos son regiones no traducibles. b) valores de disequilibrio de ligamiento (LD) entre los SNPs analizados, se identifican tres bloques con LD >80.

En todos estos polimorfismos, la frecuencia del alelo menor fue más alta en los casos que en los controles y se identificó un OR muy similar entre los diferentes SNPs. En la tabla 4 se muestran los datos tanto de las frecuencias alélicas como de los ORs que confiere cada alelo en la susceptibilidad al asma. Una vez que se corrigieron los datos con 100,000 permutaciones, únicamente los SNPs rs324640 ( $p= 0.04$ ), rs324650 ( $p= 0.03$ ), rs8191992 ( $p= 0.001$ ), rs6962027 ( $p= 0.01$ ) mantuvieron la significancia estadística, siendo este último el que mostró un mayor OR (1.63, 95% IC 1.26-2.1).

De manera interesante, el análisis comparativo entre géneros mostró que los SNPs rs978437, rs1455858 confieren riesgo al asma en población femenina pero no en la población masculina ( $p= 0.05$  vs  $p= 0.08$  y  $p= 0.05$  vs  $p= 0.09$ , respectivamente), mientras que los polimorfismos rs324640 y rs324650, evidenciaron riesgo al asma únicamente para el género masculino ( $p= 0.46$  vs  $p= 0.01$  y  $p= 0.41$  vs  $p= 0.0009$ , respectivamente). Los SNPs rs8191992 y rs6962027 mostraron asociación en ambos géneros (masculino:  $p= 0.02$  y  $p= 0.02$ ; femenino  $p= 0.007$  y  $p= 0.006$ , respectivamente) (Tabla 5).

En este gen se identificaron 6 haplotipos de frecuencias mayores a 1%; y se detectó un fuerte LD entre los polimorfismos analizados, documentando tres

ii) Factor transductor de señales y activador de la transcripción 1: *STAT1*

Se analizaron 8 SNPs distribuidos a lo largo del gen *STAT1*: rs3088307 G/C, rs13395505 G/A, rs1914408 G/A, rs2280234 T/C, rs2280232 T/G, rs13005843 C/T, rs2030171 A/G y rs1467199 C/G (Fig.15a). De estos únicamente el alelo C y G de los SNPs rs2280234 y rs2030171, respectivamente, evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en su distribución entre casos (31% vs 25%,  $p= 0.0367$ ) y controles (39% vs 32%  $p= 0.009$ ) (Tabla 7).

En el análisis de haplotipos se encontró que los SNPs asociados estaban contenidos en bloques diferentes (Fig.15b). El primer bloque lo conformaron el SNP rs2280234, rs3088307, rs13395505 y rs1914408; mientras que el segundo bloque incluyó a los SNPs rs2030171, rs2280232 y rs13005843, ambos con un valor de  $D' > 80\%$ . La distribución entre casos y controles de los dos haplotipos mostraron diferencias estadísticamente significativas. El haplotipo GGGT conformado por los alelos ancestrales del primer bloque mostró un OR de protección (OR 0.78 95% IC 0.61-0.98,  $p= 0.0238$ ); mientras que el haplotipo GCGC, el cual contenía el alelo de riesgo del rs2030171 reveló un OR de 1.65 (95% IC 1.04-2.64,  $p= 0.025$ ). Cuando se estratificó por géneros se encontró que el alelo G del rs2030171 confiere riesgo para desarrollar asma únicamente en varones (OR: 1.67, 95% IC 1.22-2.28,  $p= 0.0009$ ). Estas diferencias se observan aún después de la corrección con 100,000 permutaciones ( $p= 0.012$ ).

Interesantemente los patrones de LD revelaron diferencias entre la población femenina y masculina. En ambos casos se detectaron dos bloques de haplotipos pero la conformación de bloque 1 en el grupo de hombres incluyó 4

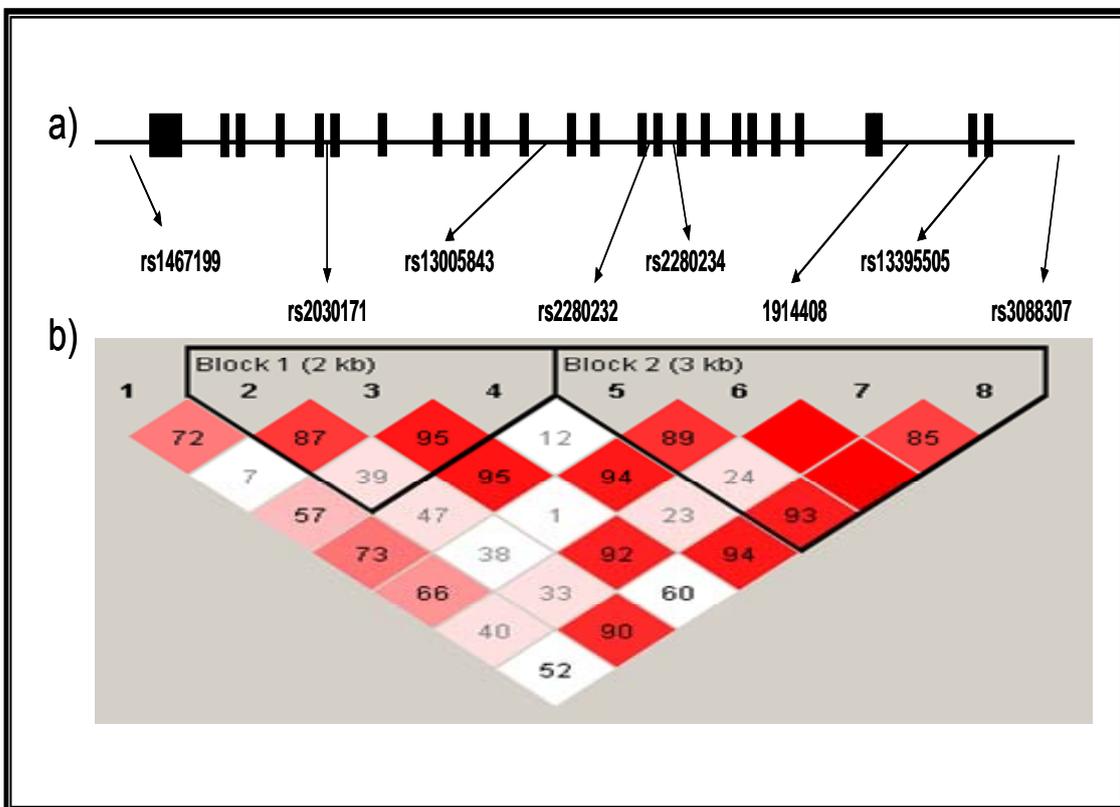


Fig. 15. Gen *STAT1*. a) Estructura del gen y localización de SNPs incluidos en este estudio. Los exones son representados por cuadros. b) valores de disequilibrio de ligamiento (LD) entre los SNPs analizados, se identifican dos bloques con LD >80.

**Tabla 7. Análisis comparativo entre casos y controles de SNPs en el gen STAT1.**

SNP	Región de STAT1	Alelo mayor/menor	MAF		OR[95% IC]	P	p*
			Contr.	Casos			
rs3088307	3' UTR	G/C	0.24	0.28	1.32 [0.96-1.83]	0.075	0.650
rs13395505	intrón 24	G/A	0.23	0.27	1.22 [0.93-1.6]	0.128	0.829
rs1914408	intrón 22	G/A	0.08	0.08	0.99 [0.64 1.53]	0.954	1.000
rs2280234	intrón 15	T/C	0.25	0.31	<b>1.17 [1.0-1.36]</b>	<b>0.036</b>	0.404
rs2280232	intrón 14	T/G	0.35	0.38	1.05 [0.91-1.22]	0.490	0.999
rs13005843	intrón 11	C/T	0.03	0.03	1.08 [0.71-1.55]	0.818	1.000
rs2030171	intrón 5	A/G	0.32	0.39	<b>1.36 [1.09-1.74]</b>	<b>0.009</b>	<b>0.036</b>
rs1467199	5'	C/G	0.13	0.11	0.84 [0.58-1.23]	0.354	0.996

MAF: frecuencia del alelo menor, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, P: valores de p con respecto al alelo menor, P\*: valores de P después de 100,000 permutaciones. La letra negrita muestra los valores con significancia estadística.

SNPs (rs3088307, rs13395505, rs1914408, rs2280234), mientras que en la población femenina este bloque no contuvo al rs2280234. En lo que respecta al bloque dos, en la población masculina, este se formó con el rs2280232, rs13005843 y rs2030171 y en el grupo de mujeres el bloque no contenía al rs2030171. Así mismo los valores de LD entre los SNPs analizados difirieron entre ambos grupos. En población masculina, se identificaron 2 haplotipos de cada bloque con diferencias estadísticamente significativas en su distribución entre casos y controles, pero ninguno de los 4 haplotipos mantuvo la significancia estadística cuando se realizó el análisis con 100,000 permutaciones. No se detectaron diferencias entre los grupos de mujeres.

## VII. DISCUSIÓN

El asma es una enfermedad que muestra una heterogeneidad clínica y genética muy compleja. Se han realizado enormes esfuerzos para identificar los factores involucrados en la génesis y en los procesos patológicos característicos de esta entidad, como son la inflamación crónica de las VA, hipersecreción de moco, HBR, remodelación, etc.

Los estudios en modelos experimentales han mostrado que las citocinas características de una respuesta TH2, particularmente la IL4, IL4R, IL5, IL9, IL13, IL13R, TNF, etc., así como proteínas liberadas por eosinófilos y mastocitos, las cuales inducen la broncodilatación y vasoconstricción de las VA, juegan un papel fundamental en el establecimiento y progresión del asma (Gruning y cols., 1998; Wills-Karp y cols., 1998; Gern y cols., 1999). Sin embargo, el conocimiento de las bases genéticas de la enfermedad es todavía un gran reto. Esto se debe a que a diferencia de las enfermedades monogénicas donde mutaciones en un solo gen se reflejan en un fenotipo patológico, en el asma y en otras entidades complejas, el efecto aditivo de variantes alélicas comunes de baja penetrancia predisponen genéticamente a los individuos para que desarrollen la enfermedad. De hecho en la actualidad se han identificado más de 100 genes cuyos polimorfismos confieren riesgo al asma, modifican la gravedad de la enfermedad o modulan la respuesta al tratamiento. Aunado a lo anterior, los análisis genéticos de pacientes asmáticos realizados en distintos países han revelado que el efecto de cada uno de estos polimorfismos en la susceptibilidad al asma es diferente entre las poblaciones y aún dentro de los individuos de una misma población (Verselli, 2008). La disparidad de estos datos puede ser debido a diferencias en el diseño de los estudios, a falsas asociaciones por la estratificación de la población o a tamaños de muestra con un insuficiente poder estadístico. Sin embargo, también puede ser el reflejo de una heterogeneidad genética inter e intrapoblacional. Por lo anterior, resulta imprescindible realizar estos estudios en cada grupo étnico para identificar los factores genéticos que contribuyen a la enfermedad, aquellos que son

compartidos entre las poblaciones y conocer a los que son específicos de cada una de ellas.

## VIII. CONCLUSIONES

1. La población mestiza mexicana no parece tener un marcador ancestral específico, como lo observado en las poblaciones reportadas por el proyecto del HapMap.
2. Existen diferencias genéticas importantes entre distintas poblaciones y la mexicana, detectada tanto en la distribución de algunos alelos de riesgo, como en su asociación con el asma.
3. Variantes alélicas de los genes *STAT1* confieren riesgo para desarrollar asma en la población infantil mexicana.

## X. REFERENCIAS

- Ahmed S, Ihara K, Sasaki Y, *et al.* Novel polymorphism in the coding region of the IL-13 receptor alpha' gene: association study with atopic asthma in the Japanese population. *Exp Clin Immunogenet* 2000;17:18-22.
- Allen M, Heinzmann A, Noguchi E, *et al.* Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14. *Nat Genet* 2003; 35:258-63.
- Babu KS, Davies DE, Holgate ST. Role of tumor necrosis factor alpha in asthma. *Immunol Allergy Clin North Am* 2004; 24:583-97.
- Baca V, Orozco L. La genética de las enfermedades complejas en: La frontera: Genética Molecular de la enfermedad. Ed. Instituto Politécnico Nacional 2004. Pp. 77-91.
- Bayley JP, Ottenhoff TH, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms?. *Genes Immun* 2004; 5:315-29.
- Bel EH. Clinical phenotypes of asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2004;10: 44-50.
- Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, *et al.* Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55:639-52.
- Bossé Y, Hudson TJ. Toward a comprehensive set of asthma susceptibility genes. *Annu Rev Med* 2007; 58:171-84.
- Brasch-Andersen C, Møller MU, Haagerup A, *et al.* Evidence for an asthma risk locus on chromosome Xp: a replication linkage study. *Allergy* 2008; 63:1235-8.
- Burchard EG, Avila PC, Nazario S, *et al.* Lower bronchodilat or responsiveness in Puerto Rican than in Mexican subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:386-92.
- Cal S, Obaya AJ, Llamazares M, *et al.* Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene* 2002; 283:49-62.
- Cameron L, Webster RB, Stempel JM, *et al.* TH2-selective enhancement of human IL13 transcription by IL13-1112C>T, a polymorphism associated with allergic inflammation. *J Immunol* 2006; 177: 8633-42.
- Carroll N, Cooke C, James A. The distribution of eosinophils and lymphocytes in the large and small airways of asthmatics. *Eur Respir J* 1997; 10:292-300.
- Cataldo D, Munaut C, Noël A, *et al.* MMP-2- and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123:259-67.
- Ceballos-Martínez ZI, Gonzalez-Mercado E, Peralta-Bahena ME, *et al.* Pattern-profile of emergency consultations of children in acute asthmatic crisis. *Rev Alerg Mex* 2003; 50:123-8.
- Chang JC, Liu CA, Chuang H, *et al.* Gender-limited association of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) polymorphism with cord blood IgE levels. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; 15:506-12.

- Chatterjee R, Batra J, Kumar A, *et al.* Interleukin-10 promoter polymorphisms and atopic asthma in North Indians. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:914-9.
- Chen Q, Rabach L, Noble P, *et al.* IL-11 receptor alpha in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Immunol* 2005;174: 2305–13.
- Chiang CH, Tang YC, Lin MW, Chung MY. Association between the IL-4 promoter polymorphisms and asthma or severity of hyperresponsiveness in Taiwanese. *Respirology* 2007; 12:42-8.
- Choudhry S, Ung N, Avila PC, *et al.* Pharmacogenetic differences in response to albuterol between Puerto Ricans and Mexicans with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:563-70.
- Choudhry S, Coyle NE, Tang H, *et al.* Genetics of Asthma in Latino Americans GALA Study. Population stratification confounds genetic association studies among Latinos. *Hum Genet* 2006; 118: 652-64.
- Contopoulos-Ioannidis DG, Kouri IN, Ioannidis JP. Genetic predisposition to asthma and atopy. *Respiration* 2007; 74:8-12.
- Cookson WO, Sharp PA, Faux JA, Hopkin JM. Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet* 1989; 1:1292-5.
- Costello RW. Pulmonary neuronal M2 muscarinic receptor function in asthma and animal models of hyperreactivity. *Thorax online* 1998; 53:613-8.
- Cui T, Wu J, Pan S, Xie J. Polymorphisms in the IL-4 and IL-4R [alpha] genes and allergic asthma. *Clin Chem Lab Med.* 2003; 4:888-92
- Daniels SE, Bhattacharyya S, James A, *et al.* A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* 1996; 383:247-50.
- Dasgupta A, Misri N, Bala S. Population and family studies to demonstrate Ir genes: HLA haplotype in atopic allergy. *Monogr Allergy* 1977; 11:75-9.
- Deichmann KA, Heinzmann A, Forster J, *et al.* Linkage and allelic association of atopy and markers flanking the IL4-receptor gene. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:151-5.
- Denham S, Koppelman GH, Blakey J, *et al.* Meta-analysis of genome-wide linkage studies of asthma and related traits. *Respir Res* 2008; 9:38.
- Dewar JC, Wheatley AP, Venn A, *et al.* Beta2-adrenoceptor polymorphisms are in linkage disequilibrium, but are not associated with asthma in an adult population. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:442-8.
- Dijkstra A, Howard TD, Vonk JM, *et al.* Estrogen receptor 1 polymorphisms are associated with airway hyperresponsiveness and lung function decline, particularly in female subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:604-11.
- Donfack J, Kogut P, Forsythe S, *et al.* Sequence variation in the promoter region of the cholinergic receptor muscarinic 3 gene and asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:527-32.
- Donnadieu E, Cookson WO, Jouvin MH, Kinet JP. Allergy-associated

- polymorphisms of the Fc epsilon RI beta subunit do not impact its two amplification functions. *J Immunol* 2000; 165:3917-22.
- Durcan N, Costello RW, McLean WG, *et al.* Eosinophil-mediated cholinergic nerve remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34:775-86.
- Fenech AG. Novel polymorphisms influencing transcription of the human CHRM2 gene in airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30:678-86.
- Fenech AG, Ebejer MJ, Felice AE, *et al.* Mutation screening of the muscarinic M2 and M3 receptor genes in normal and asthmatic subjects. *Br J Pharmacol* 2001; 133:43-8.
- Fenech, A., Hall, P. Pharmacogenetics of asthma. *Br J Clin Pharmacol* 2002; 53:3-15.
- Finkelstein Y, Bournissen FG, Hutson JR, Shannon M. Polymorphism of the ADRB2 gene and response to inhaled beta- agonists in children with asthma: a meta-analysis. *J Asthma* 2009; 46:900-5.
- Finotto S. T-cell regulation in asthmatic diseases. *Chem Immunol Allergy* 2008; 94:83-92.
- Fisher JT, Vincent SG, Gomez J, *et al.* Loss of vagally mediated bradycardia and bronchoconstriction in mice lacking M2 or M3 muscarinic acetylcholine receptors. *FASEB J* 2004; 18:711-3.
- Gallardo-Martínez G, Arias-Cruz A, González-Díaz SN, Galindo Rodríguez G. [Costs due to asthma medical care in a group of children from northeastern Mexico]. *Rev Alerg Mex* 2007; 54:82-5.
- Ganter K, Deichmann KA, Heinzmann A. Association study of polymorphisms within matrix metalloproteinase 9 with bronchial asthma. *Int J Immunogenet* 2005; 32:233-6.
- Gao PS, Huang SK. Genetic aspects of asthma. *Panminerva Med* 2004; 46:121-34.
- Gern JE, Lemanske RF Jr, Busse WW. Early life origins of asthma. *J Clin Invest* 1999; 104:837-43.
- GINA (Global Initiative for Asthma). Pocket guide for asthma management and prevention for children. 2007.
- Goetzl EJ, Banda MJ, Leppert D. Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol* 1996; 156:1-4.
- Graves PE, Kabesch M, Halonen M, *et al.* A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:506-13.
- Greenlee KJ, Corry DB, Engler DA, *et al.* Proteomic identification of in vivo substrates for matrix metalloproteinases 2 and 9 reveals a mechanism for resolution of inflammation. *J Immunol* 2006; 177:7312-21.
- Gruning, G., Warnock, M., Wakil, A.E., *et al.* Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 1998; 282:2261-63.

## **XI. GLOSARIO**

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

**Alérgeno:** Proteína o sustancia que induce una reacción alérgica.

**Análisis de ligamiento:** Se evalúa la cosegregación de un marcador con la enfermedad.

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

**Bialélico:** Dos alternativas (A o G, G o T, etc.).

**Caso índice:** Individuo bajo estudio.

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

**Cosegregar:** Herencia conjunta de dos marcadores por su cercanía física o dos caracteres por que existe una relación entre sí.

**Desequilibrio de Ligamiento (LD):** Segregación de dos o más marcadores en un porcentaje mayor al esperado (>50%) por que 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 resultado 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, consanguinidad, etc.

**Estudio de ancestría:** Evaluación del componente ancestral de cada población.

Se incluyen marcadores polimórficos que permiten definir el origen étnico de los grupos de estudio.

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

**Estudio de 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.

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

**Frecuencia alélica:** Porcentaje de un alelo determinado en una población.

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

**Gen candidato:** Gen que por su función puede jugar un papel relevante en la etiología de una enfermedad.

**Genome Wide scan o estudios amplios del genoma.** Estudios en los que un arreglo denso de marcadores genéticos, los cuales capturan una proporción substancial de variaciones comunes en la secuencia del genoma es tipificado en un set de muestras de ADN 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 entre dos grupos 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.

**RFLP:** Variación en la longitud de fragmentos de ADN generados por endonucleasas de restricción. Estas variaciones son causadas por mutaciones que generan o eliminan sitios de corte de enzimas de restricción.

**Sonda:** Molécula de ADN que permite identificar genes o secuencias específicas de genes.