



**35 Aniversario**

**IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**“IDENTIFICACIÓN DE SNPs EN GENES INVOLUCRADOS EN LA  
RESPUESTA INMUNE E INFLAMATORIA ASOCIADOS A ASMA INFANTIL”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

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

M. EN BIOL. EXP. SILVIA JIMÉNEZ MORALES

**DIRECTORES**

DRA. LORENA OROZCO OROZCO  
DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ

**ASESOR**

DR. ENRIQUE MIRANDA PERALTA

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE 2009

## COMITÉ TUTORAL

### UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA

**“Identificación de SNPs en genes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria asociados a asma infantil”**

**Silvia Jiménez Morales**

17 de Diciembre de 2009

**Dra. Lorena Orozco Orozco**

Laboratorio de Enfermedades Multifactoriales  
Instituto Nacional de Medicina Genómica  
[lorozco@inmegen.gob.mx](mailto:lorozco@inmegen.gob.mx)

**Dr. Edmundo Bonilla González**

Laboratorio de Biología Celular y Molecular  
Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa  
[mundo@xanum.uam.mx](mailto:mundo@xanum.uam.mx)

**Dr. Enrique Miranda Peralta**

Laboratorio de Biología Molecular  
Servicio de Hematología  
Hospital General de México  
[pmiranda@servidor.unam.mx](mailto:pmiranda@servidor.unam.mx)

Los miembros del jurado de examen designados por el Posgrado de Biología Experimental, abajo firmantes, aprobaron la tesis “**IDENTIFICACIÓN DE SNPs EN GENES INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA INMUNE E INFLAMATORIA ASOCIADOS A ASMA INFANTIL**” desarrollada por la M. en B.E. Silvia Jiménez Morales quien realizó la disertación pública el 17 de Diciembre de 2009 en las Instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

---

**PRESIDENTE**

Dr. José Miguel Betancourt Rule  
Área de Biología Celular y Molecular  
Depto. de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana

---

**SECRETARIO**

Dr. Enrique Miranda Peralta  
Lab. de Biología Molecular,  
Servicio de Hematología  
Hospital General de México

---

**VOCAL**

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura  
Depto. de Biología de la Reproducción  
Universidad Autónoma Metropolitana

---

**VOCAL**

Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza  
Lab. de Biología Molecular,  
Depto. de Invest. en Genética Humana.  
Instituto Nacional de Pediatría

En la búsqueda constante del conocimiento, puedes caer un millón de veces, tropezar dos millones más, puedes dudar o volver los pasos atrás, puedes incluso sólo por una vez ganar, pero en todo ello, la esencia de DIOS y el amor de ustedes me impulso para que lograra esta meta alcanzar.

A Amelia y Martín con amor.

A mis queridos hermanos, como un reconocimiento a su constante lucha por cristalizar sus sueños.

El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Iztapalapa pertenece al Padrón de Excelencia de Posgrados del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de registro: PNP-C UAM-I: 0904-0

Silvia Jiménez Morales agradece a CONACyT por distinguirla con la beca 153007.

Este proyecto fue realizado en el Laboratorio de Enfermedades Multifactoriales, Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) en colaboración con el Laboratorio de Biología Molecular y Celular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.

## **MIS INSTITUCIONES**

Mi mayor agradecimiento es a la **Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa** por permitirme ser parte de ella, por darme la oportunidad de formarme profesionalmente en sus aulas y de disfrutar de sus pasillos y de su gente; sobre todo por tener la fortuna de que la experiencia y los conocimientos de mis queridos maestros me fueran compartidos.

Al **Instituto Nacional de Medicina Genómica**, por la confianza depositada en mí, por su gran interés en impulsar el crecimiento humano, profesional y la búsqueda constante del conocimiento. Gracias a su gente, a mis maestros, a mis colaboradores y a mis compañeros.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis queridos maestros: La Dra. Lorena Orozco, el Dr. Edmundo Bonilla y el Dr. Enrique Miranda, por sus enseñanzas, su apoyo y estímulos constantes en este nuevo reto. Su amistad, su paciencia y el permitirme alcanzar esta meta a lado de ustedes, me ha dado la enorme oportunidad de aprender y de seguir creciendo. ¡Gracias, por ser parte de este éxito!.

Y por inducirme a ser cada vez mejor, Dra. Orozco, ¡muchas gracias!

A mi Comité de evaluación, el Dr. Miguel Betancourt, el Dr. Miguel Ángel Alcántara y el Dr. Pablo Damián, por sus importantes contribuciones en la calidad de este manuscrito, por sus conocimientos compartidos, por el apoyo constante y más aún por su invaluable amistad. ¡Gracias!.

A la comunidad académica de la UAMI, particularmente a la Dra. Mina Konigsberg, la Dra. Laura Pérez y a la Lic. Julieta Luna, por conducir con éxito el Posgrado y por su disponibilidad para orientar y ayudar al estudiante.

A Juan Luis, Efraín, Diana, Roberto, Iván y Luis Ángel por permitirme crecer a su lado como profesional, por su entusiasmo, su confianza, su amistad y por su importante contribución en el desarrollo experimental de esta tesis.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio; una broma, un abrazo, una sonrisa, un estímulo, unas flores, un pastel, una palmadita, un consejo, una expresión de ¡Felicidades! cuando se compartió el éxito, ¡Gracias!, valoro enormemente su amistad y su tiempo compartido.

A mis compañeros de las Unidades de Secuenciación y de Microarreglos del INMEGEN, gracias por trabajar como equipo.

A mis colaboradores, los Dres. Nora Martínez Aguilar, Blanca Estela del Río Navarro, Sandra Romero, Efraín Navarro, Javier Gómez Vera, Francisco Cuevas, Mariano Guardado, Guillermo Escamilla y Juan Gabriel Maldonado, porque sin su participación esto no hubiera sido posible.

A los pacientes y sus familiares, quienes contribuyeron con la esperanza de ayudar a otros y a quienes debo el éxito de este proyecto.



## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE TABLAS .....	xiv
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
I. INTRODUCCIÓN .....	3
I.1. ASMA .....	4
I.1.1 Definición .....	4
I.1.2 Diagnóstico clínico .....	4
I.1.3 Clasificación .....	5
I.1.4 Fisiopatología .....	6
I.1.5 Etiopatogenia .....	11
I.1.5A Factores ambientales .....	11
I.1.5B Factores intrínsecos .....	13
I.1.5C Factores genéticos .....	13
a) Evidencias de la participación de los factores genéticos en asma .....	15
i) Estudios en familias .....	15
ii) Estudios en gemelos .....	15
b) Estrategias para la identificación de genes en asma .....	15
i) Estudios de ligamiento .....	15
ii) Estudios de asociación .....	18
Casos y controles .....	18
Asociación basada en familias .....	20
iii) Estudios amplios del genoma .....	21

c) Genes asociados a asma .....	23
i) Citocinas y sus receptores .....	25
ii) Complejo principal de histocompatibilidad .....	28
iii) Factores de transcripción .....	29
iv) Metaloproteasas .....	30
v) Receptores de broncodilatadores y broncoconstrictores .....	31
vi) Otros genes asociados .....	32
II. JUSTIFICACIÓN .....	34
III. HIPÓTESIS .....	35
IV. OBJETIVOS .....	35
IV.1 Objetivo general .....	35
IV.2 Objetivos particulares .....	35
V. METODOLOGÍA .....	36
V.1 Tipo de estudio .....	36
V.2. Estrategia general .....	36
V.2.1 Población de estudio .....	36
V.2.2 Análisis genético .....	38
V.2.2A Extracción de ADN a partir de sangre periférica .....	39
V.2.2B Cuantificación y evaluación de la integridad del ADN .....	39
V.2.2C Análisis del componente ancestral de casos y controles .....	40
V.2.2D Análisis de genes candidatos .....	40
a) Diseño de oligonucleótidos y sondas específicas .....	42
b) Método fluorescente de 5' exonucleasa (TaqMan) .....	42
c) Validación de SNPs mediante enzimas de restricción .....	42
V.2.2E Búsqueda de nuevos SNPs .....	44
V.2.2F Búsqueda de nuevos genes candidato .....	47

V.2.3 Análisis de resultados e interpretación de datos .....	49
VI. RESULTADOS .....	50
VI.1 Población de estudio .....	50
VI.2 Análisis genético .....	50
VI.2.1 Análisis del componente ancestral de casos y controles .....	50
VI.2.2 Análisis de genes candidato .....	50
VI.2.2A Genes no asociados a asma en la población mexicana .....	52
VI.2.2B Genes asociados al asma en población mexicana .....	52
a) Genes nuevos .....	52
i) Receptor de acetilcolina M2: <i>CHRM2</i> .....	52
ii) Factor transductor de señales y activador de la transcripción 1: <i>STAT1</i> .....	58
iii) Genes <i>ADRB2</i> , <i>GATA3</i> , <i>PDCD1</i> y <i>CHRM3</i> .....	62
b) Genes asociados a asma en población mexicana y en otras poblaciones .....	62
i) Factor de necrosis tumoral alpha: <i>TNF<math>\alpha</math></i> .....	63
ii) Interleucina 13: <i>IL13</i> .....	65
iii) Metaloproteasa 9: <i>MMP9</i> .....	69
VI.2.3 Identificación de nuevos polimorfismos .....	72
VI.2.4 Identificación de nuevos genes candidato .....	72
VII. DISCUSIÓN .....	78
VIII. CONCLUSIONES .....	92
IX. PERSPECTIVAS .....	93
X. REFERENCIAS .....	94
XI. GLOSARIO .....	104
XII. ANEXO	
XII.1 Hoja de captación de datos .....	107
XII.2 Artículo de investigación .....	113

## **ABREVIATURAS**

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADR $\beta$ 2	Receptor beta 2 adrenérgico
AIM	Marcador informativo de ancestría
CHRM	Receptor de acetilcolina tipo muscarínico
CNV	Variaciones en el número de copias
CPA	Célula presentadora de antígeno
DC	Dicigoto
LD	Desequilibrio de ligamiento
dNTP	Deoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético
FCERB	Receptor de alta afinidad a inmunoglobulina E
FEV1	Volumen espiratorio forzado por un segundo
GATA3	Proteína 3 de unión a secuencias GATA
GINA	Iniciativa global para el asma
GM-CSF	Factor estimulador de crecimiento de la colonia de macrófagos
GWS	Escaneo completo del genoma
HLA	Antígeno leucocitario humano
HRB	Hiperrespuesta bronquial
IC	Intervalo de confianza
Ig	Inmunoglobulina
IgE	Inmunoglobulina E
IL	Interleucina
IL4R	Receptor alfa de la interleucina 4
INP	Instituto Nacional de Pediatría
ISAAC	Estudio Internacional del Asma y la Alergia en la Niñez
INMEGEN	Instituto Nacional de Medicina Genómica

ISSSTE	Instituto de Seguridad Social para los Trabajadores del Estado
Kb	Kilobases
DL	Desequilibrio de ligamiento
MAF	Frecuencia del alelo menor o mutado
MC	Monocigoto
MMP	Metaloproteasas
OR	Riesgo relativo
P	Probabilidad
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RANTES	Regulado en activación, secretado y expresado por células T normales
RFLP	Fragmento de restricción de longitud polimórfica
TCR	Receptor de linfocitos T
TDT	Prueba de desequilibrio de transmisión
Th	Célula T colaboradora
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alpha
Treg	Células T reguladoras
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
UTR	Región no traducible del gen
UV	Luz ultravioleta
VA	Vías aéreas
VDR	Receptor de vitamina D

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representación esquemática de los cambios anatomopatológicos que se observan en las vías aéreas de pacientes con asma (Pág. 8).
- Figura 2. Representación esquemática de los mecanismos y moléculas involucrados en la patogénesis del asma (Pág. 9).
- Figura 3. Etiología del asma (Pág. 12).
- Figura 4. Enfermedad monogénica vs enfermedad compleja (Pág. 14).
- Figura 5. Análisis de ligamiento (Pág. 17).
- Figura 6. Estudio de asociación. (Pág. 19).
- Figura 7. Análisis amplio del genoma (Pág. 22).
- Figura 8. Estrategia general (Pág. 37).
- Figura 9. Análisis de integridad de DNA (Pág. 41).
- Figura 10. Análisis de TaqMan (Pág. 43).
- Figura 11. Análisis de secuenciación automática (Pág. 45).
- Figura 12. Análisis de Microarreglos (Pág. 48).
- Figura 13. Análisis comparativo en la distribución de AIMs reportadas en el HAPMAP y la analizada en este estudio (Pág. 51).
- Figura 14. Gen *CHRM2* (Pág. 55).
- Figura 15. Gen *STAT1* (Pág. 60).
- Figura 16. Gen *IL13* (Pág. 66).
- Figura 17. Gen *MMP9* (Pág. 71).
- Figura 18. SNP rs8191992 (Pág. 74).
- Figura 19. Plot del  $-\log_{10}$  del valor de p organizado por cromosoma (Pág. 75).

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Genes que han mostrado evidencia de asociación con asma y sus fenotipos relacionados en más de 5 estudios independientes (Pág. 24).
- Tabla 2. Lista de primers para la secuenciación de los genes *CHRM2* y *CHRM3* (Pág. 46).
- Tabla 3. Genes y polimorfismos que no mostraron asociación con susceptibilidad a padecer asma (Pág. 53).
- Tabla 4. Análisis comparativo entre casos y controles de alelos del gen *CHRM2* (Pág. 57).
- Tabla 5. Análisis comparativo entre casos y controles de alelos del gen *CHRM2* entre géneros (Pág. 57).
- Tabla 6 Análisis comparativo entre casos y controles de haplotipos del gen *CHRM2* (Pág. 59).
- Tabla 7. Análisis comparativo entre casos y controles de SNPs en el gen *STAT1* (Pág. 61).
- Tabla 8. Análisis comparativo entre casos y controles de SNPs en el gen *TNF $\alpha$*  (Pág. 64).
- Tabla 9. Análisis comparativo de alelo *TNF $\alpha$ -308A* entre géneros (Pág. 64).
- Tabla 10. Análisis comparativo entre casos y controles de SNPs en el gen *IL13* (Pág. 67).
- Tabla 11. Análisis del SNP rs1881457 en el gen *IL13* (Pág. 67).
- Tabla 12. Análisis comparativo entre casos y controles de haplotipos del gen *IL13* (Pág. 68).
- Tabla 13. Análisis comparativo entre casos y controles de SNPs en el gen *MMP9* (Pág. 70).
- Tabla 14. Análisis comparativo entre casos y controles de haplotipos del gen *MMP9* (Pág. 73).
- Tabla 15. SNPs que mostraron diferencias significativas en el análisis de microarreglos (Pág. 77).

## 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 240 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 93 SNPs localizados en 29 genes candidato y 10 marcadores de ancestría. Por secuenciación automática de 100 controles y 100 casos, se buscaron SNPs en los genes *CHRM2* y *CHRM3* y para identificar nuevos genes candidatos se analizaron 120 casos y 130 controles a través de microarreglos de ADN (Affymetrix V6.0). Los datos se analizaron mediante los programas ADMIXMAP, FINETTI, HAPLOVIEW, EPIINFO, QUANTO, Sequence Scanner y Helix Tree. **Resultados:** Se identificaron SNPs en los genes *CHRM2*, *STAT1*, *GATA3*, *PDCD1* y *CHRM3* como nuevos factores de riesgo genético para asma y se confirmó la asociación descrita entre *TNF $\alpha$* , *IL13*, y *MMP9* y asma. Interesantemente, genes que se han asociado con asma en más de 10 estudios independientes no mostraron asociación en nuestra población. Así, el análisis de secuenciación mostró que las regiones codificantes de los genes *CHRM2* y *CHRM3* no contienen SNPs y el análisis de microarreglos reveló a *ETS1* y *ADAMTS19* como nuevos genes candidato. **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. Además, se debe determinar si los genes *ETS1* y *ADAMTS19* contribuyen a la etiología del asma.



## 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:** Two hundred and forty 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 93 SNPs in 29 candidate genes. To discard false associations due to sample stratification, we analyzed 10 ancestry informative markers which had been validated elsewhere in Mexican populations. Data were analyzed using the ADMIXMAP, FINETTI, HAPLOVIEW, EPIINFO, QUANTO, Sequence Scanner and Helix Tree programs. **Results:** SNPs in the *CHRM2*, *STAT1*, *GATA3*, *PDCD1*, *ADRB2* and *CHRM3* genes were identified as new genetic risk factors for asthma and we confirmed the association between *IL13*, *TNF $\alpha$* , and *MMP9* genes with the disease. In contrast, genes associated with asthma and related phenotypes in more than 10 studies worldwide, were not associated in our population. Otherwise, the sequencing analysis showed that the coding regions of *CHRM2* and *CHRM3* genes do not have SNPs and the microarrays analysis suggest that *ETS1* and *ADAMTS19* could be new candidate genes for asthma. **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 and determinate the role of the *ETS1* and *ADAMTS19* genes in asthma etiology.

## **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 esta 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.I.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

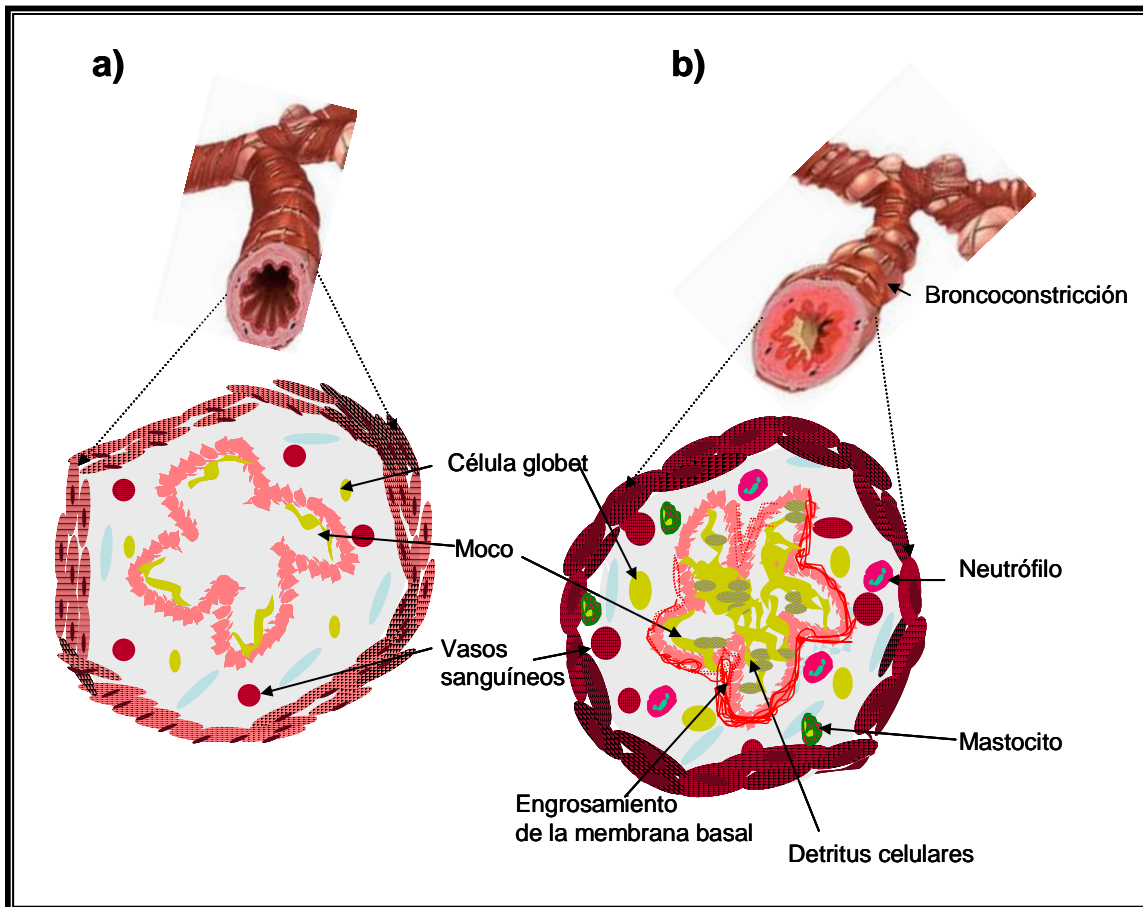


Fig. 1. Representación esquemática de los cambios anatomopatológicos que se observan en las vías aéreas de pacientes asmáticos. a) Bronquiolo normal, b) bronquiolo asmático.

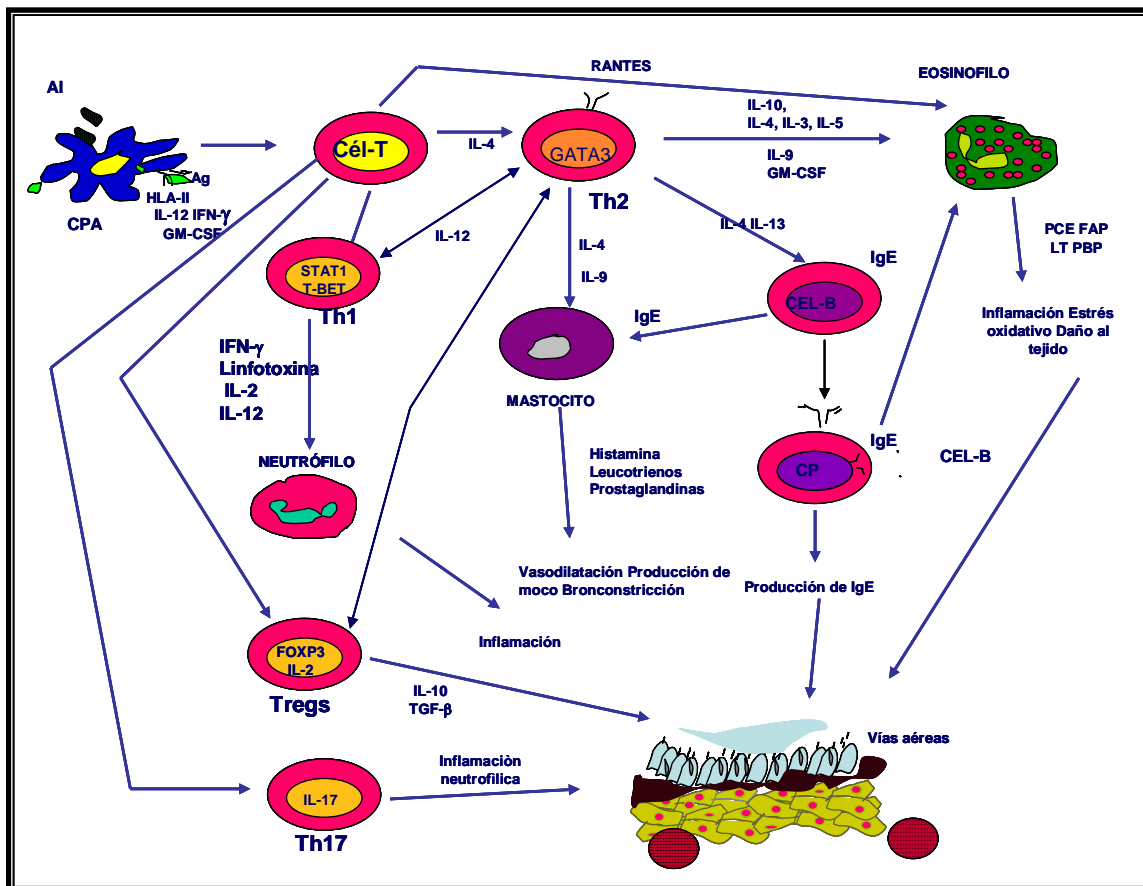


Fig. 2. Representación esquemática de los mecanismos y moléculas involucrados en la patogénesis del asma. CPA: célula presentadora de antígeno; FAP: factor activador de plaquetas; GM-CSF; factor estimulador de crecimiento de la colonia de macrófagos; IgE: Inmunoglobulina E; IFN $\gamma$ : interferón 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 quimoatrayente 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,

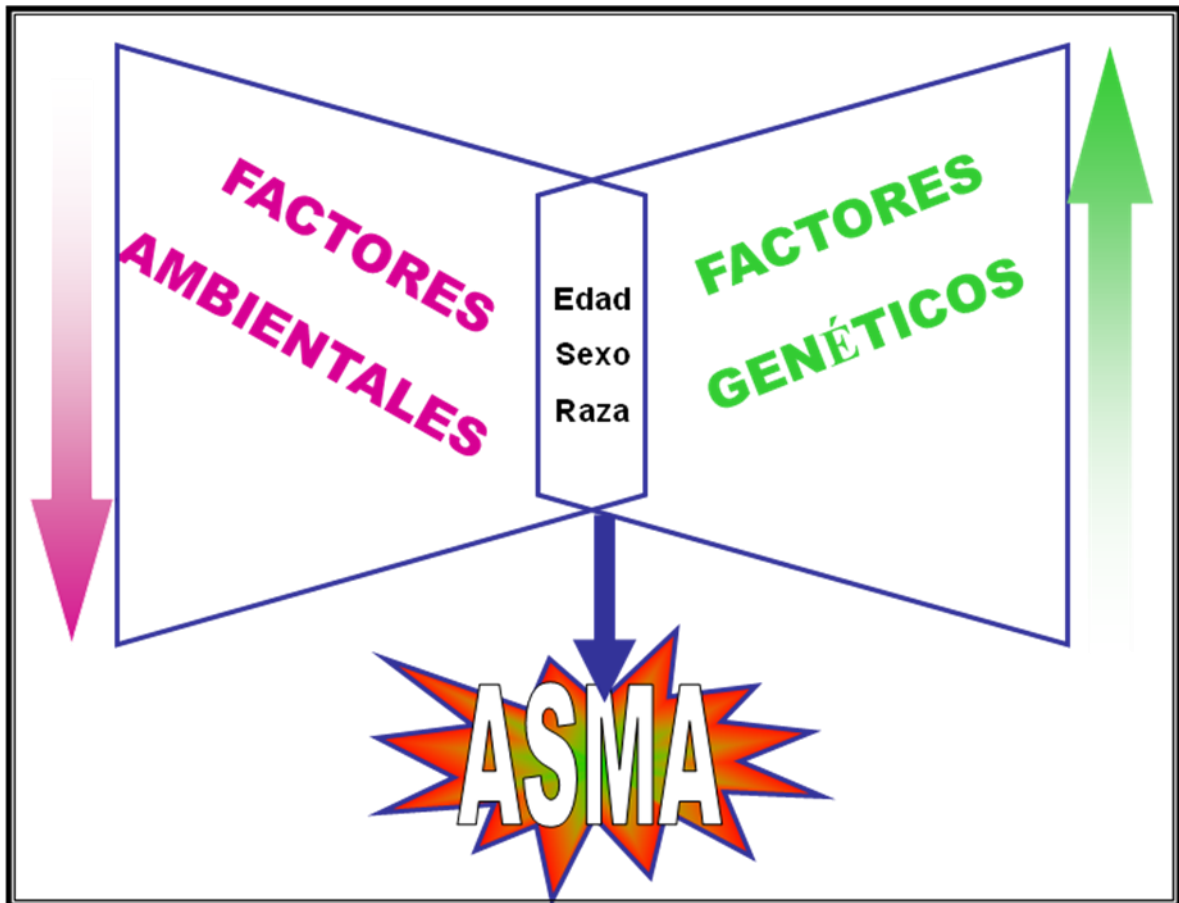


Fig. 3. Etiología del asma. El asma es una entidad de origen multifactorial en cuyo desarrollo intervienen factores ambientales (polvo, ácaros, etc.) y genéticos (genes de respuesta inmune, de remodelación de vías aéreas, etc.). Se propone que la interacción entre estos factores es inversamente proporcional.

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).

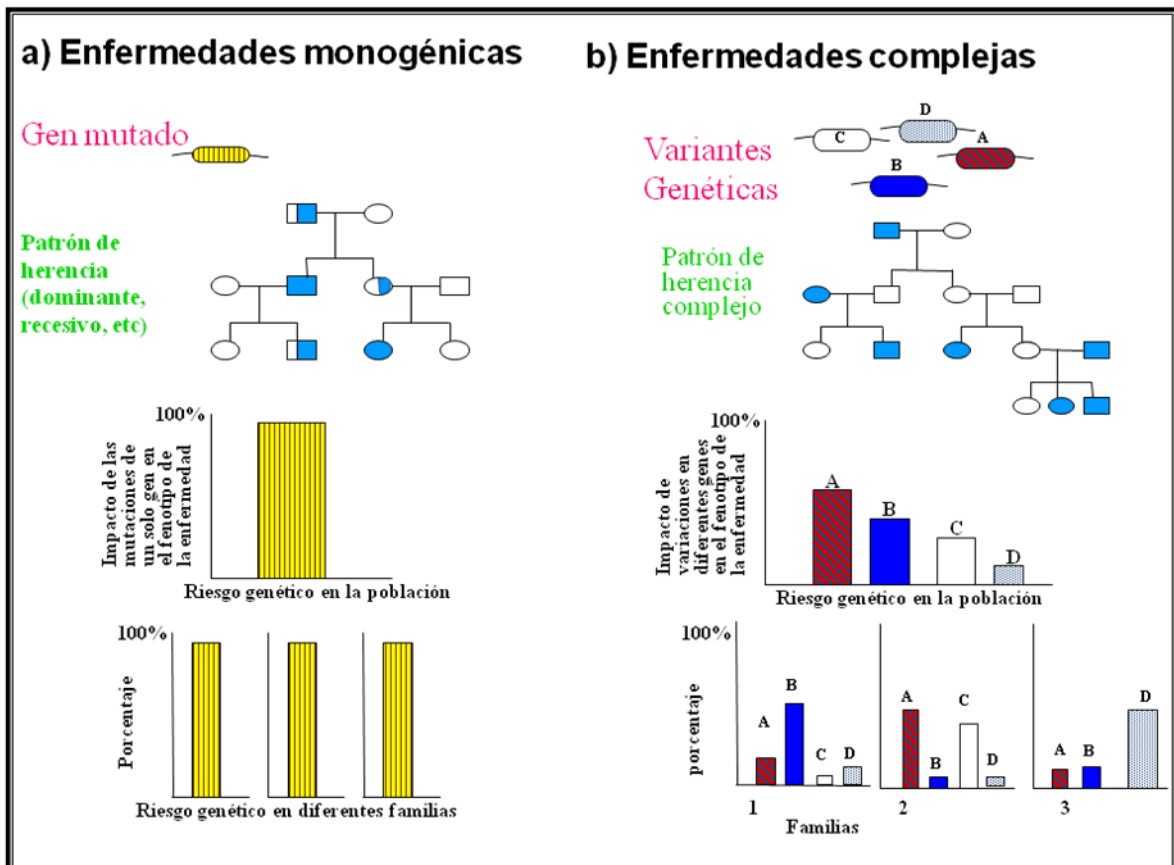


Fig. 4. Enfermedad monogénica vs enfermedad compleja. a) Un gen es el responsable de la enfermedad, se identifica un patrón de herencia, el riesgo para portadores de mutaciones en el gen es el mismo aún entre individuos de distintas poblaciones; b). Varios genes son responsables de la enfermedad, no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

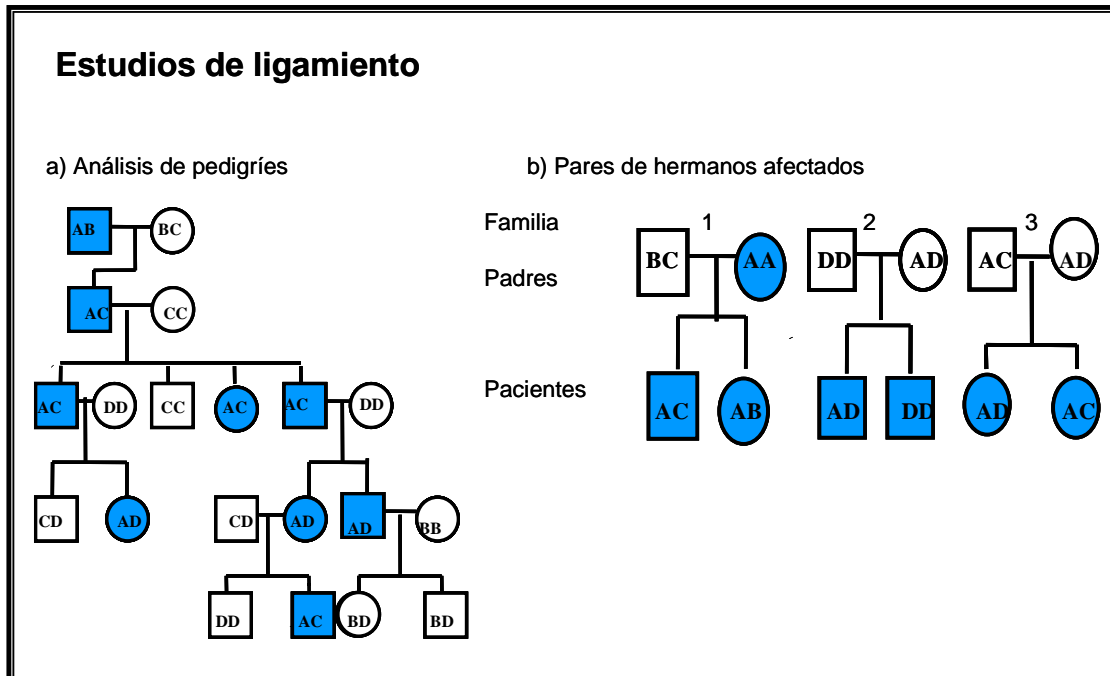


Fig. 5. Análisis de ligamiento. En ambos casos se evalúa la frecuencia con la que un marcador cosegrega con la entidad. Este marcador puede ser el responsable de la enfermedad o estar en cercanía física con el gen causal.



## *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 parear el grupo de casos y controles de acuerdo con su origen étnico (Choudhry y cols., 2006).

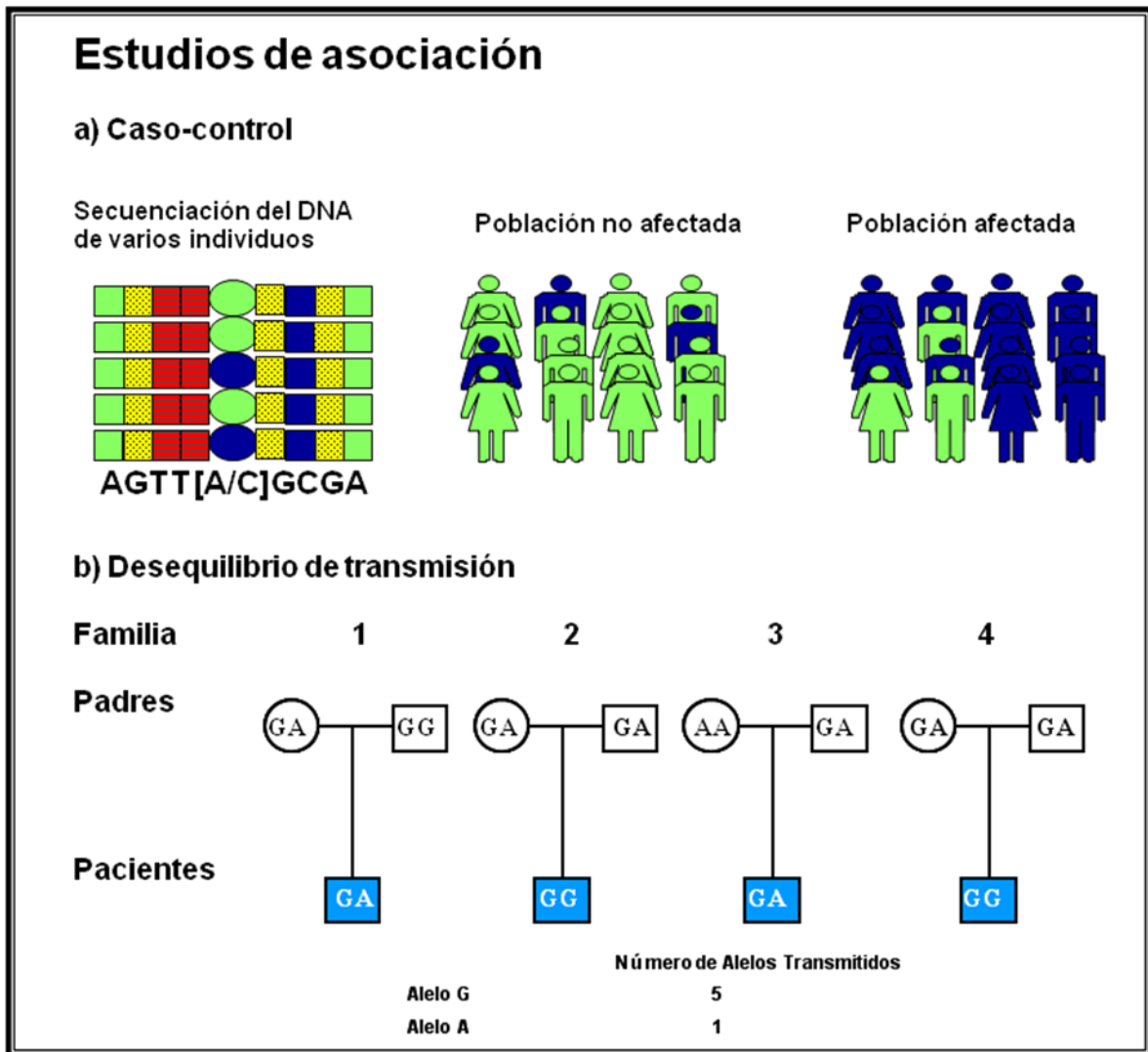


Fig. 6. Estudio de asociación. a) Compara las frecuencias del alelo de un polimorfismo entre casos y controles y b) compara la frecuencia con la que padres heterocigotos transmiten este alelo a su hijo enfermo.

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).

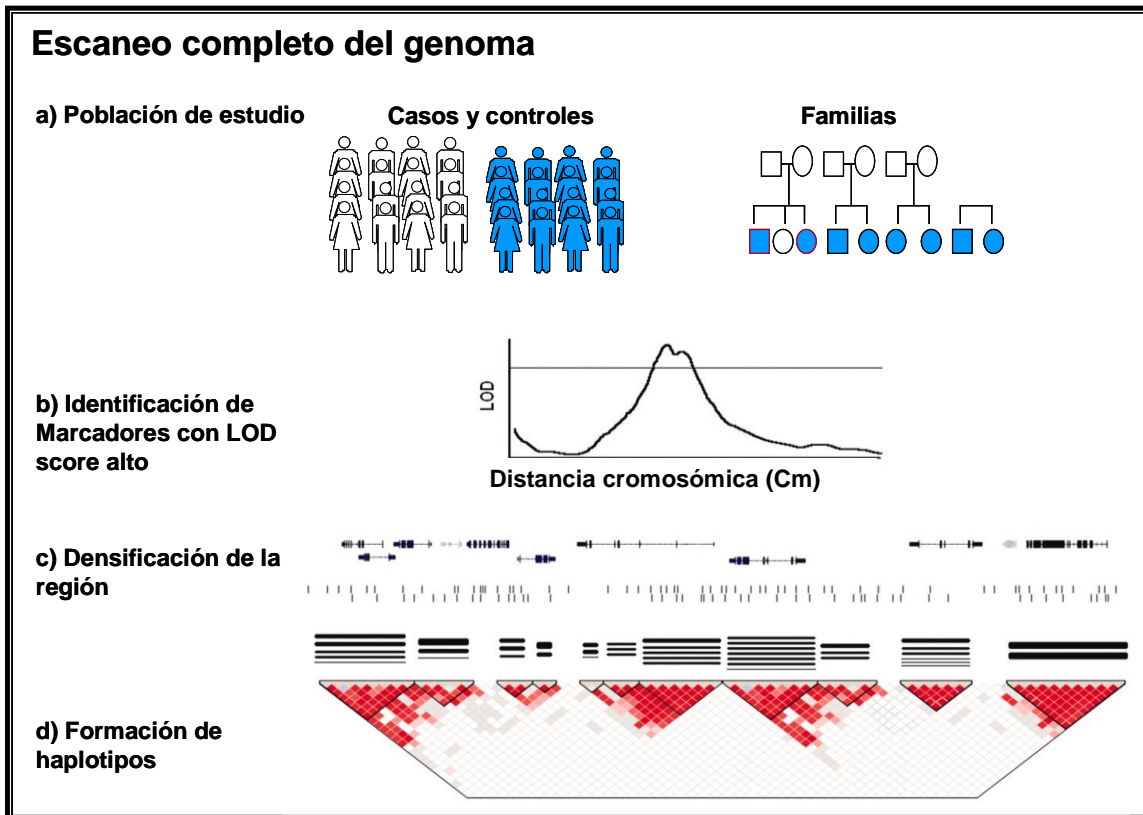


Fig. 7. Análisis amplio del genoma. a) Se analizan casos y controles o familias, b) se identifican las regiones cromosómicas que son flanqueadas por los marcadores con más nivel de ligamiento (LOD score > 3), c) se analizan más marcadores dentro de la región, d) se generan haplotipos para identificar 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>	6p21	Múltiples alelos	Presentación de antígenos
- <i>DQB1</i>			
- <i>DPB1</i>			
<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) <sub>n</sub> 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 *ADR $\beta$ 2* 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 *ADR $\beta$ 2*, *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 alergenios, 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 el 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  $\epsilon$  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, atopia 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 esta 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 desintegrasa 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 en 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 (Gi/o) y que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos están ligados a proteínas G estimuladoras (Gs). 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*<sup>-/-</sup> desarrollaban una mayor respuesta broncoconstrictora ante un estímulo con acetilcolina, mientras que esta respuesta es nula en ratones deficientes de *chrm3* (*M3*<sup>-/-</sup>). 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 *GPRA* (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. Conocer el componente ancestral de un grupo de pacientes con asma y parearlos con un grupo de individuos sanos.
2. Determinar si SNPs localizados en genes asociados con asma en otras poblaciones confieren susceptibilidad o protección a padecer esta enfermedad en niños mexicanos.
3. Identificar nuevos SNPs en genes candidato.
4. Identificar haplotipos de riesgo o protección para padecer asma.
5. 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.
7. Identificar SNPs etiqueta ("tags" SNPs) en población mexicana.
8. Identificar nuevos genes asociados a la susceptibilidad o protección para desarrollar asma, mediante microarreglos de ADN.

## **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 240 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 96 SNPs utilizando sondas TaqMan. Por otro lado, se realizó el análisis de secuenciación de los genes *CHRM2* y *CHRM3* en 100 casos y 100 controles y se estudiaron 120 muestras de casos y 130 de controles mediante microarreglos de ADN. Los datos derivados con los tres (Fig. 8). A continuación se detalla la estrategia desarrollada en el estudio.

#### **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 atopía; 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

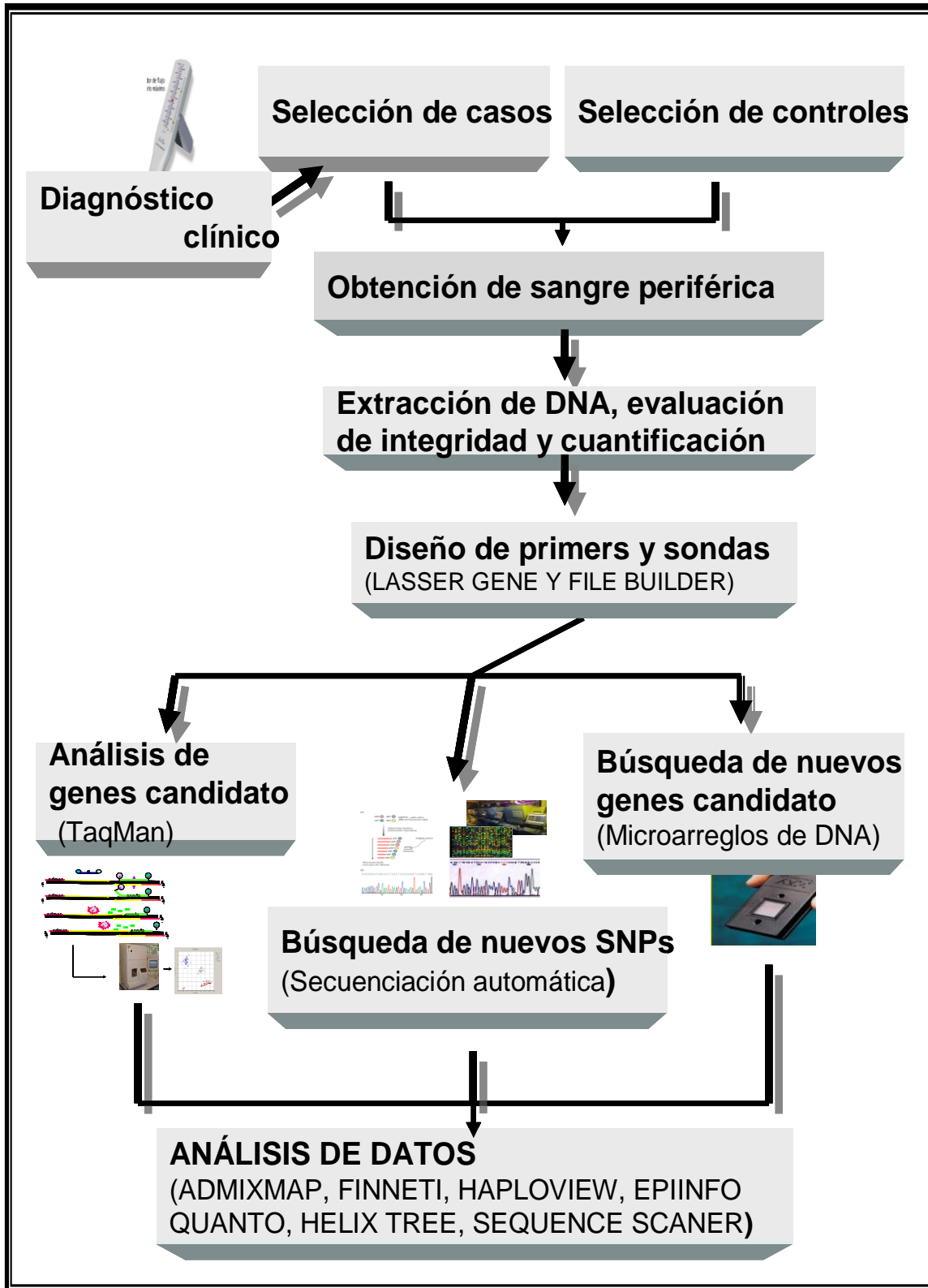


Fig. 8. Estrategia general.

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 un estudio de ancestría para descartar estratificación de las poblaciones incluidas en este trabajo, genotipificación de SNPs localizados en 29 genes candidato, secuenciación de la región codificante de dos genes altamente conservados (en donde los modelos *in silico* sugieren que cambios en su secuencias pueden afectar de manera importante la actividad de la proteína) y análisis de microarreglos de ADN para la identificación de nuevos 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  $\mu$ l 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/ $\mu$ l, 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  $\mu$ l 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 del componente ancestral de casos y controles***

Para descartar datos de asociación falsos positivos debido a estratificación de la población, se analizó la ancestría de la muestra incluyendo 10 AIMs. En la determinación de los genotipos se realizó la técnica de discriminación alélica usando sondas TaqMan y el método fluorescente de la 5' exonucleasa (Applied Biosystem Foster City, CA, USA). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo de acuerdo a las especificaciones del proveedor (Applied Biosystem) y en un termociclador en tiempo real 7900 HT (Applied Biosystem Foster City, CA, USA). Los AIMs utilizados fueron: rs2814778, rs2065160, rs3340, rs2695, rs1800498, rs2862, rs3830, rs3096, rs4884 y rs722098, los cuales se han validado en pacientes mexicanos con otras patologías complejas (Martínez-Marignac y cols., 2007; Villareal-Molina y cols., 2007).

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

En este análisis se incluyeron 95 SNPs distribuidos en 29 genes candidato, tales como: *ADRB2*, *IL4*, *IL4R*, *IL10*, *IL12B*, *IL8*, *FCER1 $\beta$* , *RANTES*, *PDCD1*, *CTLA4*, *STAT4*, *STAT6*, *DPP10*, *CD14*, *VDR*, *TNFR1*, *GATA3*, *TIMP1*, *CHRM3*, *SPINK5*, *RAD50*, *CHRM1*, *FCRL3*, *GM-CSF2*, *CHRM2*, *TNF $\alpha$* , *IL13*, *MMP9* y *STAT1*, 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.

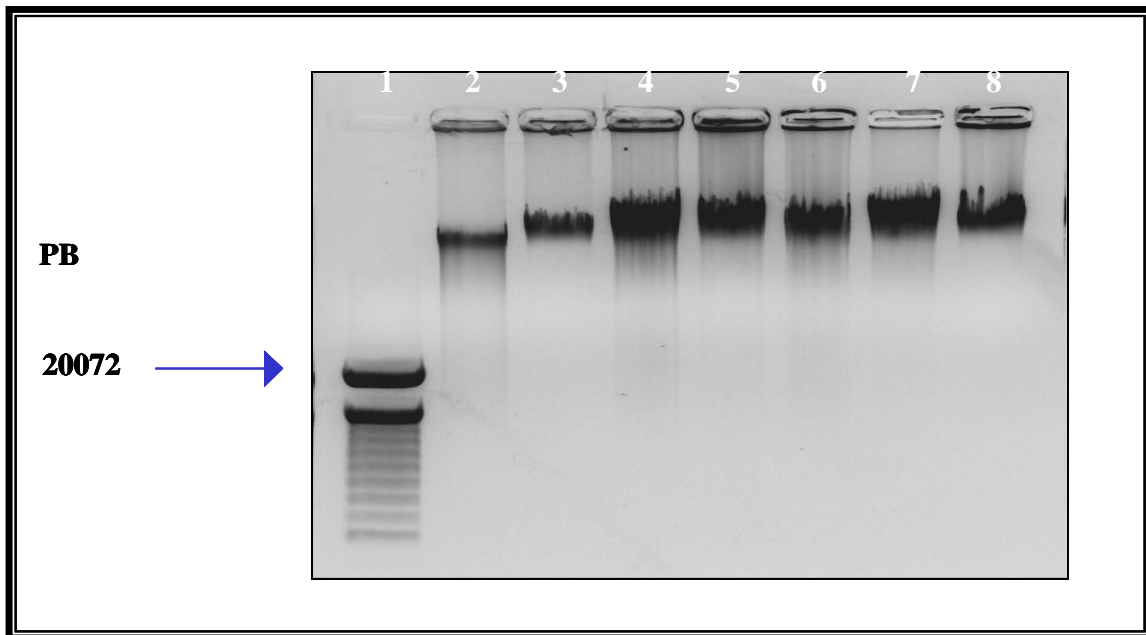


Fig. 9. Análisis de integridad de ADN. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2-8: ADN de pacientes.



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).

c) Validación de SNPs mediante enzimas de restricción

Dos de los polimorfismos localizados en el gen *ADRβ2* (Arg16Gly, Glu27Gln) y en el gen *IL4R* (Ile150Val), se validaron mediante fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs). La amplificación de las regiones genéticas que contienen estos polimorfismos se llevó a cabo en un termociclador 9700 (Applied Biosystems Foster City, CA, USA). La reacción se realizó con 50 ng de ADN, 2nM de dNTPs, 2.5 pmoles de cada primer, 2U de AmpliTaq Gold polimerasa y 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1X de buffer (Applied Biosystem Foster City, CA,

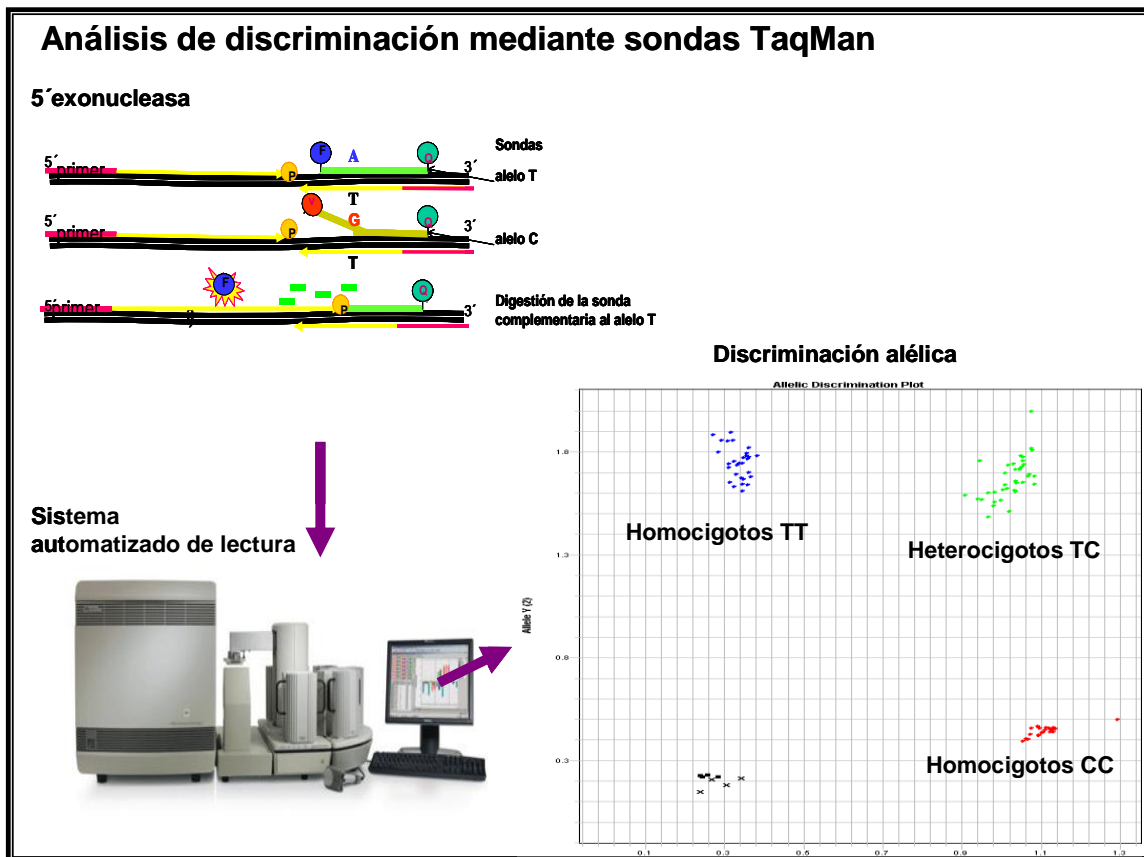


Fig. 10. Análisis de TaqMan. a) La polimerasa (p) digiere la sonda que es 100% complementaria al ADN blanco, de esta forma el fluorocromo que la identifica (F o V) emite fluorescencia, la cual es detectada en un sistema automatizado (b). Por las diferencias en la longitud de onda entre F o V, se pueden 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.2.2E Búsqueda de nuevos SNPs**

Para validar los datos derivados del estudio de discriminación alélica en aquellos SNPs que dieron evidencias de asociación con asma y para identificar nuevos polimorfismos en los genes *CHRM2* y *CHRM3* se realizó un análisis de secuenciación automática (Fig. 11).

La secuenciación de los genes *CHRM2* y *CHRM3* incluyó sus regiones codificantes y algunas bases aledañas localizadas en las regiones 5' y 3' UTRs. Los pares de iniciadores utilizados fueron los descritos por Fenech y cols., (2001) (Tabla 2) y se utilizó el kit Big Dye Terminator v3. Las condiciones de amplificación fueron: 50 ng de ADN genómico, 2.5 pmoles de cada iniciador, 2 mM de cada .dNTP, 1 U de AmpliTaq Gold ADN Polimerasa, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1X de buffer (Applied Biosystems Foster City, CA, USA). El programa PCR incluyó un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 10 min, seguido de 35 ciclos que consistieron cada uno en desnaturalización a 95°C por 20 seg, alineación a 60°C por 30 seg y extensión a 72°C por 30 seg. En el último ciclo la extensión se

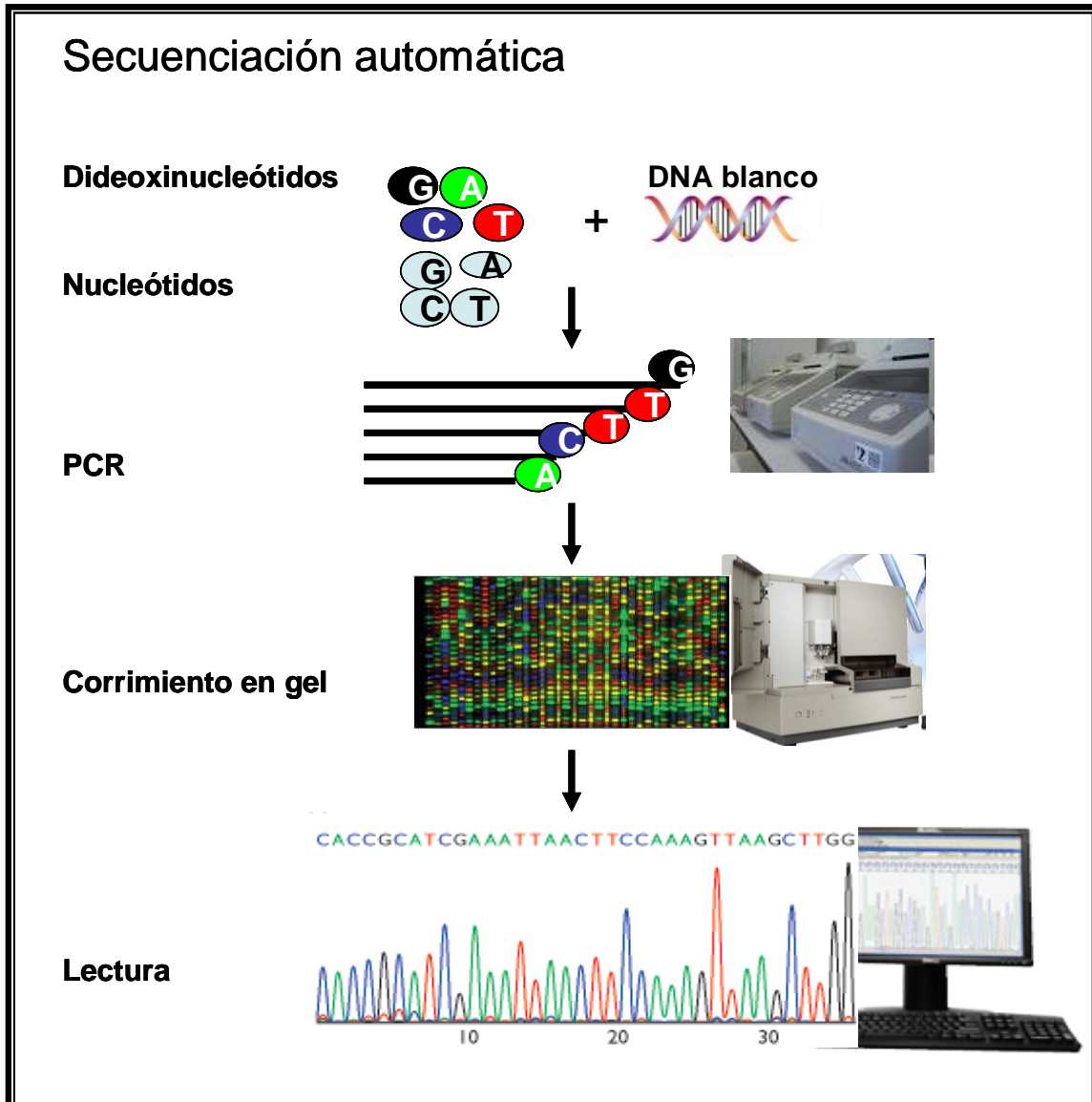


Fig. 11. Análisis de secuenciación automática. Se realiza una PCR con dinucleótidos (dNTPs) y dideoxynucleótidos (ddNTPs). Cuando los ddNTPs ( marcados con fluorocromos) se integran a la cadena en crecimiento, se interrumpe la replicación del ADN. El producto de la PCR se somete a electroforesis capilar y los resultados se analizan mediante un software.

**Tabla 2. Lista de primers para la secuenciación de los genes *CHRM2* y *CHRM3*.**

<b>Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Producto (pb)</b>	<b>Temperatura de alineación</b>
<i>CHRM2</i>	1M2-F	GAC ACA GTA ATC ATG CAG	572	60
	1M2-R	GCA GAT TCA TAA CTG AGG CAT		
	2M2-F	CCC TCT ACA CTG TGA TTG GT	521	60
	2M2-R	ACT TGG AGA AAC GGG GTC		
	3M2-F	GGA TAA AGA AGG ACA AGA AGG	572	62
	3M2-R	AGT CAT CTT CAC AAT CTT GCG		
	4M2-F	AGT GGG GTC TTC AGG TCA	562	62
	4M2-R	CCT TTT ATT CTT CTC AAG CTC		
	5M2-F	TGA AAA AGA TAG AAG GTG GG	568	62
	5M2-R	TAT GTC CCC ATT GTA TAG TG		
<i>CHRM3</i>	1M3-F	TTC AGC ACC CTG TAA TAG GC	525	60
	1M3-R	ATA ATC AGA TCG GCA CAG GC		
	2M3-F	AAG ACG GTC AAC AAC TAC TTC	464	60
	2M3-R	GAG GAA CTG AAT GAA GCA CTC		
	3M3-F	GTT GGA AAG AGA ACT GTG CC	542	60
	3M3-R	GCT TGA GCA CGA TGG AGT AG		
	4M3-F	AGG ACA TTG GCT CCG AGA CG	588	60
	4M3-R	GAT GTA GCA CAG CCA GTA GC		
	5M3-F	TGA ACA CCT TTT GTG ACA GC	289	60
	5M3-R	AGG TCT GTG GGT TGA TGT GT		

prolongó por 7 min. La PCR se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems Foster City, CA, USA).

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2.5%, se purificaron utilizando el kit QIAquick PCR bajo las condiciones establecidas por el proveedor (QUIAGEN) y se cuantificaron mediante espectrometría. La secuenciación se llevó a cabo con el Kit ADN Sequencing Kit con Big Dye Terminator en un secuenciador automático ABI PRISM 3100 ADN (Applied Biosystems Foster City, CA, USA). Las secuencias obtenidas se compararon con las descritas en la base electrónica de datos NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

#### **V.2.2F Búsqueda de nuevos genes candidato**

Para la búsqueda de nuevos genes candidato se utilizó el análisis de microarreglos. La infraestructura de Affymetrix SNP Array 6.0, incluye 1.8 millones de sondas para identificar alrededor de un millón de SNPs (906,600) y aproximadamente 950 mil sondas para detectar CNVs. En estos microarreglos, las sondas están ordenadas y unidas a una superficie sólida de sílice, a la cual se hibrida el ADN problema marcado con un fluorocromo. La presencia de los polimorfismos se detecta en un sistema automatizado (Fig. 12). Para este análisis se utilizaron 250 ng de ADN genómico de 130 casos y 120 controles. El ADN fue digerido con las enzimas de restricción HindIII y XbaI. Los productos de la restricción, fueron sometidos a amplificación en presencia de un fluorocromo mediante PCR utilizando oligonucleótidos que reconocen los sitios de restricción de cada enzima. Posteriormente se llevó a cabo el análisis de la emisión de fluorescencia. La técnica se realizó bajo las especificaciones del proveedor (Affymetrix Inc) (GeneChip® Mapping 500K Assay Manual).

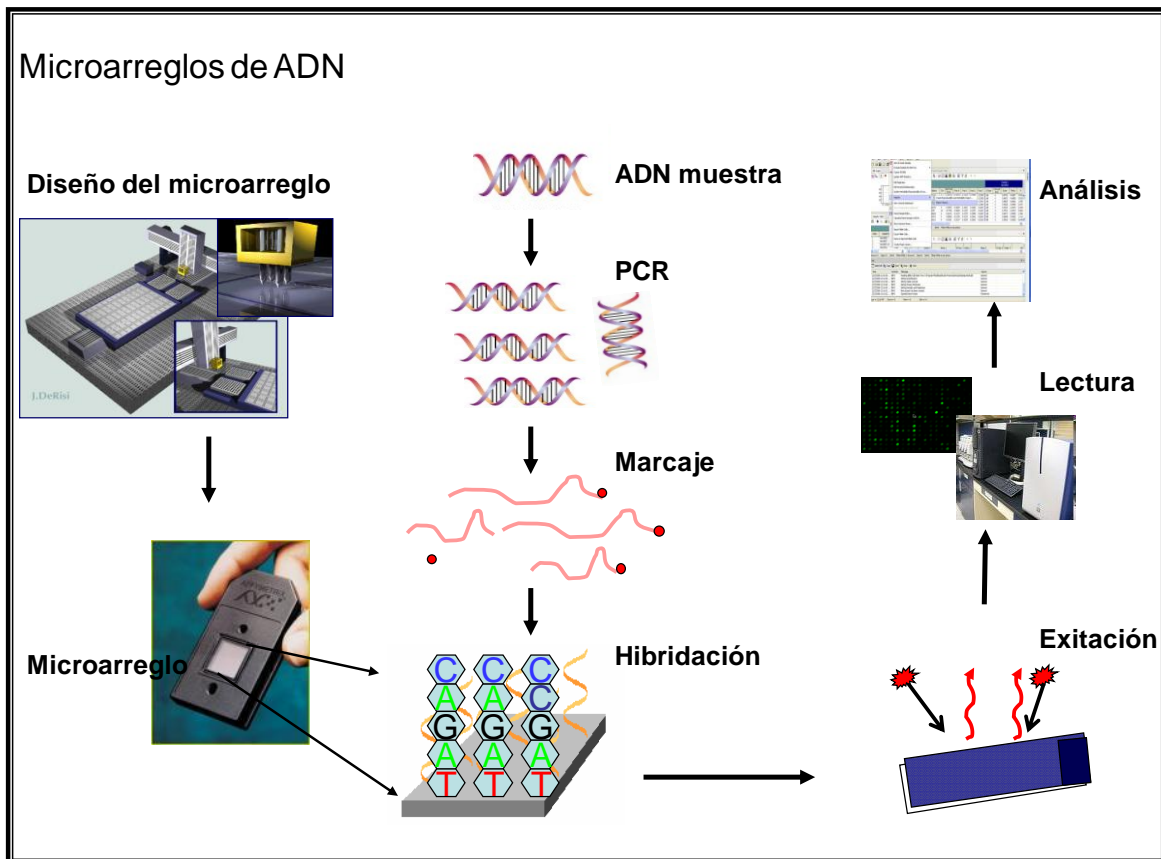


Fig. 12. Análisis de Microarreglos. El ADN de interés es digerido con enzimas de restricción, se somete a amplificación, se marca con un fluorocromo, se realiza una reacción de hibridación y se analiza en un escáner.

### **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 X<sup>2</sup> 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. Por otra parte, los microarreglos fueron analizados con los programas Genotyping Console (Affymetrix® Genotyping Console™ Software) y Helix Tree, este último implementado en el programa GOLDEN HELIX ([http://www.goldenhelix.com/SNP\\_Variation/index.html](http://www.goldenhelix.com/SNP_Variation/index.html)).



## VI. RESULTADOS

### VI.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se estudiaron un total de 240 pacientes no relacionados con diagnóstico clínico de asma antes de los 17 años de edad. De estos 156 (65%) fueron masculinos y 84 (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.

### VI.2. ANÁLISIS GENÉTICO

#### VI.2.1 Análisis del componente ancestral de casos y controles

El análisis de los 10 AIMs, mostró diferencias significativas entre casos y controles solamente en la distribución de alelo A del SNPs rs3340, (42.1 vs 37.6 respectivamente,  $p=0.0169$ ). Cabe señalar que este resultado puede ser explicado porque el marcador rs3340 se localiza en la región cromosómica 5q33, aledaño a los loci de por lo menos 6 genes que han mostrado evidencias de asociación con asma.

Por otro lado, el análisis comparativo de las frecuencias alélicas de los AIMs obtenidas en este estudio con las reportadas por el proyecto internacional del HapMap (<http://www.hapmap.org/>), confirmó la presencia de una gran heterogeneidad genética en la población analizada (Fig. 13).

#### VI.2.2 Análisis de genes candidato

La distribución de los genotipos de los 93 SNPs localizados en 29 genes candidato que se incluyeron en el análisis de asociación, se encontraron en HWE, excepto para el SNP rs4526098 (*RAD50*).

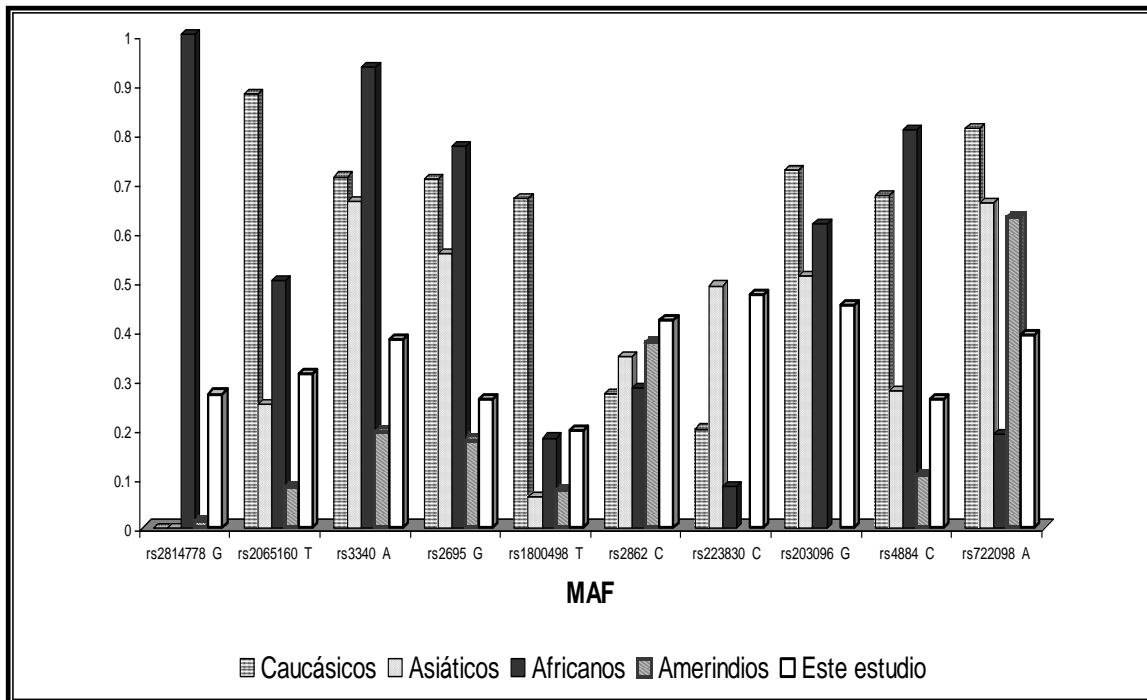


Fig. 13. Análisis comparativo en la distribución de marcadores de ancestría (AIMs) entre poblaciones reportadas en el HAPMAP y la mestiza mexicana analizada en este estudio.

### **VI.2.2A Genes no asociados a asma en la población mexicana**

Una vez que se corroboró la ausencia de estratificación en las poblaciones de estudio, se procedió al análisis de discriminación alélica en genes candidato para asma. En la tabla 3 se muestran las frecuencias de polimorfismos localizados en los genes *IL4*, *IL4R*, *IL10*, *IL12B*, *IL18*, *FCER1 $\beta$* , *RANTES*, *CTLA4*, *STAT4*, *STAT6*, *DPP10*, *CD14*, *VDR*, *TNFR1*, *TIMP1*, *SPINK5*, *RAD50*, *CHRM1*, *FCRL3* y *GM-CSF2*, en donde el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas no revelaron diferencias significativas entre pacientes y controles. Cabe aclarar que aunque el alelo G del SNP rs945636 (*FCRL3*) se encontró en menor frecuencia en casos que en controles (44.3 vs 49.6, OR 0.79 IC 0.63-1, p= 0.047) y el alelo C del SNP rs1469149 (*GM-CSF2*) mostró una frecuencia más elevada en el grupo de pacientes (20.1 vs 15.7, OR 1.35 IC 1-1.83, p=0.042), en ambos casos, la significancia estadística se perdió después del análisis de corrección de Bonferroni, por lo que no se consideraron asociados a la enfermedad.

### **VI.2.2B Genes asociados al asma en población mexicana**

En este análisis, se identificaron SNPs que confieren susceptibilidad a asma en 9 genes, reportándose por primera vez asociación entre *CHRM2*, *STAT1*, *GATA3*, *PDCD1*, *ADR $\beta$ 2* y *CHRM3* y esta entidad. Frecuentemente, *ADR $\beta$ 2* se ha asociado a gravedad y respuesta a tratamiento, en el presente estudio se documenta que el genotipo Glu27/Glu27 es un factor genético de riesgo a asma.

#### **a) Genes nuevos**

##### *i) Receptor de acetilcolina M2: CHRM2*

Para el análisis del gen *CHRM2* se analizaron 7 SNPs (rs8191992 A/T, rs978437 G/A, rs1456858 A/G, rs1824024 G/T, rs324640 G/A, rs324650 A/T, rs6962027 A/T) localizados en intrones o regiones UTRs (Fig. 14a). El análisis comparativo de las frecuencias alélicas y genotípicas entre casos y controles,

**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>IL4</i>	rs2243250	C	48.4	50.0	0.594
	rs2070874	C	47.1	49.1	0.503
	rs4986964	C	0.001	0.001	--
<i>IL4R</i>	rs1805010	G	51.5	44.9	0.2771
	rs1805015	C	14	16	0.6678
	rs1801275	A	30.5	33.8	0.4821
<i>IL10</i>	rs1800896	C	21.8	16.1	0.1935
	rs1800871	G	42.8	37.5	0.3305
<i>IL12B</i>	rs6870828	C	39.3	33.3	0.19
	rs3181217	T	36.6	35.2	0.8319
<i>IL18</i>	rs4073	T	31.3	33.7	0.42
<i>FCER1B</i>	rs535630	T	0.05	0	1.0
	rs569108	C	1.1	1.7	0.7075
	rs502581	C	24.3	17.4	0.0797
	rs6870828	T	39.2	33.3	0.1914
<i>RANTES</i>	rs2107538	C	33.7	37.3	0.4979
	rs1800825	C	1.8	1.2	0.48
	rs2306630	C	0	0	-
<i>CTLA4</i>	rs3087243	A	42.6	44.5	0.68
<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>DPP10</i>	rs2053724	C	14.8	15.02	0.92
<i>TNFR1</i>	rs4149570	A	32.6	30.2	0.38
	rs767455	C	30.5	27.0	0.18
	rs2234679	G	5.4	6.4	0.46

**Tabla 3. (Cont.)**

<i>VDR</i>	Fok	A	50.58	44.18	0.14
<i>CD14</i>	rs2228049	A	0	0	-
<i>TIMP1</i>	rs4898	C	37	45	0.110
	rs1062849	C	37	45	0.104
	rs5953060	G	0	0	--
<i>SPINK5</i>	rs4349706	C	21.0	21.5	0.8559
	rs3777134	G	20.6	21.3	0.8295
<i>RAD50</i>	rs4526098	A	1.0	1.8	0.2314
	rs11209026	A	1.9	2.7	0.3145
<i>CHRM1</i>	rs11605665	T	13.2	12.4	0.71
<i>FCRL3</i>	rs7528684	G	49.6	44.3	0.60
	rs1126479	T	23.7	23.5	0.949
	rs945636	G	49.3	43.6	0.047
	rs3761959	T	48.7	43.9	0.0911
<i>GM-CSF2</i>	rs1469149	C	15.7	20.1	0.042
	-130	G	25.0	23.8	0.6411

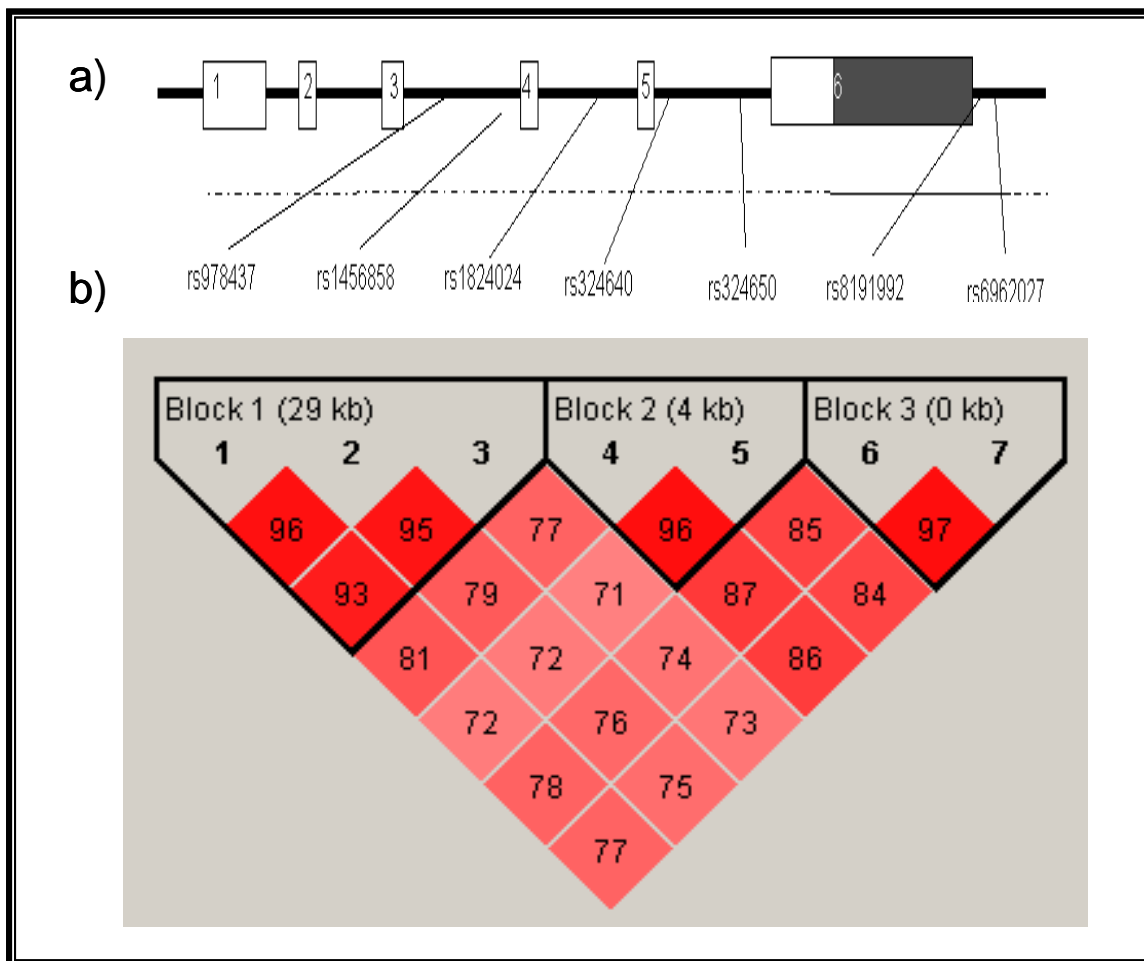


Fig. 14. Gen *CHRM2*. a) Estructura del gen y localización de SNPs incluidos es este estudio. Los exones son representados por cuadros, los cuadros blancos son regiones no traducibles. b) valores de disequilibrio de ligamiento (LD) entre los SNPs analizados, se identifican tres bloques con LD >90.

reveló una fuerte evidencia de asociación con los 7 SNPs de este gen. 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).

Por otro lado, el análisis de genotipos para determinar el modelo bajo el que estos polimorfismos influyen el desarrollo del asma mostró que en población femenina, a excepción del rs8191992 los SNPs asociados incrementan el OR significativamente en estado homocigoto (rs978437 AA: OR 3.01 IC 95% 1.23-7.38,  $p= 0.01$ ; rs1455858 GG: OR 3.11, 95% IC 1.22-7.89,  $p= 0.01$  y rs6962027 TT: OR 3.38, 95% IC 95% 1.1-10.35,  $p= 0.025$ ) incluyendo el genotipo TT del rs1824024 (2.83, 95% IC 1.1-7.29,  $p= 0.02$ ). Mientras que en la población masculina las diferencias significativas se detectan en estado heterocigoto (rs324650 AT: OR 2.12, 95% IC 1.36-3.27,  $p= 0.0007$  y rs8191992 TA: OR 2.15, 95% IC 1.4-3.32,  $p= 0.0004$ ), incluyendo el genotipo AG del rs324640 (OR 1.86, 95% IC 1.2-2.88,  $p= 0.004$ ).

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

**Tabla 4. Análisis comparativo entre casos y controles de alelos del gen *CHRM2*.**

SNP	Región de <i>CHRM2</i>	Alelo mayor/menor	MAF		OR[95% IC]	P	P*
			Contr.	Casos			
rs978437	intrón 3	G/A	0.31	0.38	1.34 [1.05-1.6]	<b>0.01</b>	0.08
rs1455858	intrón 3	A/G	0.31	0.38	1.35[1.06-1.71]	<b>0.01</b>	0.08
rs1824024	intrón 4	G/T	0.31	0.37	1.32[1.04-1.68]	<b>0.02</b>	0.18
rs324640	intrón 5	G/A	0.21	0.28	1.38 [1.42-1.94]	<b>0.001</b>	<b>0.04</b>
rs324650	intrón 5	A/T	0.22	0.30	1.49 [1.15-1.9]	<b>0.001</b>	<b>0.03</b>
rs8191992	3'UTR	A/T	0.22	0.30	1.52 [1.18-1.97]	<b>0.0001</b>	<b>0.001</b>
rs6962027	3'UTR	A/T	0.22	0.32	1.63[1.26-2.1]	<b>0.001</b>	<b>0.01</b>

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.

**Tabla 5. Análisis comparativo de alelos del gen *CHRM2* entre géneros.**

SNP	Masculino		OR[95% IC]	P	Femenino		OR[95% IC]	P
	MAF				MAF			
	Cont.	Casos			Cont.	Casos		
rs978437	0.33	0.39	1.3 [0.95-1.77]	0.08	0.27	0.36	1.47 [0.98-2.2]	<b>0.05</b>
rs1455858	0.33	0.39	1.29 [0.95-1.76]	0.09	0.27	0.35	1.47 [0.98-2.2]	<b>0.05</b>
rs1824024	0.33	0.37	1.28[0.94-1.74]	0.1	0.27	0.35	1.4[0.93-2.12]	0.09
rs324640	0.22	0.31	1.63 [1.17-2.29]	<b>0.01</b>	0.2	0.23	1.18 [0.74-1.89]	0.46
rs324650	0.23	0.34	1.71 [1.23-2.38]	<b>0.0009</b>	0.2	0.23	1.18 [0.74-1.88]	0.41
rs8191992	0.23	0.31	1.49 [1.06-2.08]	<b>0.02</b>	0.2	0.29	1.63[1.04-2.25]	<b>0.02</b>

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.



bloques con un valor de  $D' > 90$  (Fig. 14b). La distribución del haplotipo AGTATTT que contiene los alelos de riesgo mostró diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles (controles: 16% vs casos: 21%,  $p = 0.02$ ) y un OR de 1.42 (95% IC 1.05-1.91), significancia que se perdió después de un análisis con 100,000 permutaciones (Tabla 6).

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

**Tabla 6 Análisis comparativo entre casos y controles de haplotipos del gen *CHRM2*.**

Haplotipo (rs978437, rs1455858, rs1824024, rs324640, rs324650, rs8191992, rs6962027)	Frecuencia		OR[95% IC]	<i>P</i>	<i>P</i> *
	Controles	Casos			
GAGGAAA	0.63	0.55	0.71[0.56-0.9]	<b>0.001</b>	<b>0.01</b>
AGTATTT	0.16	0.21	1.42[1.05-1.91]	<b>0.02</b>	0.12
AGTGAAA	0.1	0.09	2.26[0.88-5.85]	0.47	0.99
GAGATTT	0.02	0.04	1.84[0.75-4.51]	0.13	0.77
AGTGATT	0.01	0.03	1.49[0.73-3.04]	0.11	0.63
AGTATAA	0.01	0.03	0.87[0.58-1.31]	0.08	0.43

Haplotipos con frecuencias < 0.01 no se muestran; OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza; *P*\*: valores de p después de 100,000 permutaciones. La letra negra muestra los valores con significancia estadística.

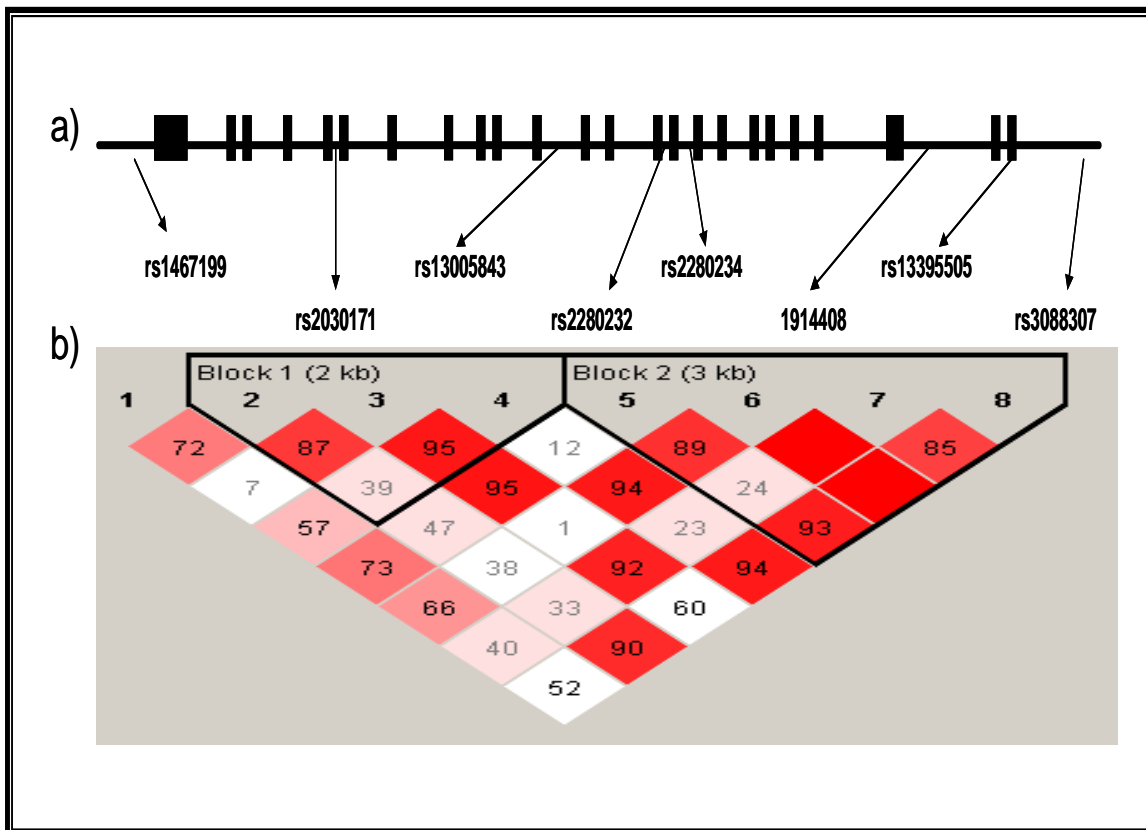


Fig. 15. Gen *STAT1*. a) Estructura del gen y localización de SNPs incluidos es este estudio. Los exones son representados por cuadros. b) valores de desequilibrio de ligamiento (LD) entre los SNPs analizados, se identifican dos bloques con LD >80.

**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 negra 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.

*iii) Genes ADRB2, GATA3, PDCD1 y CHRM3.*

Una observación interesante en los genes *ADRB2*, *GATA3*, *CHMR3* y *PDCD1* es que el análisis comparativo entre casos y controles de los alelos de riesgo de los SNPs rs1042714 (*ADRB2*), rs1269486 (*GATA3*) y rs10204525 (*PDCD1*) no reveló diferencias significativas. Sin embargo, cuando se compararon los genotipos entre casos y controles, se observó asociación de estos con asma. Los genotipos homocigotos Glu27 del gen *ADRB2* y rs1269486A de *GATA3* mostraron ORs muy elevados para la susceptibilidad al asma (4.37, 95% IC 1.206-15.9,  $p= 0.01529$ ; 5.04, 95% IC 1.21-24.17,  $p= 0.00870$ , respectivamente), mientras que para el genotipo AA del SNPs rs10204525 (*PDCD1*), este riesgo fue de 2.39 (95% IC 1.12-5.23,  $p= 0.022$ ). En lo que respecta al gen *CHRM3*, el haplotipo AGACTTC, el cual contiene todos los alelos de riesgo, confirió un OR de 2.24 (1.04-4.85,  $p= 0.0288$ ).

**b) Genes asociados a asma en población mexicana y en otras poblaciones**

En este análisis se confirmó la asociación entre SNPs localizados en los genes *TNF $\alpha$* , *IL13* y *MMP9*, como previamente se había descrito en otras

poblaciones

i) Factor de necrosis tumoral alfa: *TNF $\alpha$*

Cuando se compararon las frecuencias de los polimorfismos -308G/A (rs1800629) y -238G/A (rs361525) entre los grupos de estudio incluidos en esta tesis, se encontró una mayor frecuencia del alelo -308A en pacientes asmáticos comparado con los controles (6.0 vs 2.9% respectivamente, OR= 2.32, 95% IC 1.28-4.2,  $p= 0.002$ ), sugiriendo que el alelo A de este polimorfismo tiene un papel en la susceptibilidad para desarrollar asma (Tabla 8).

La significancia estadística de los hallazgos en el SNP -308G/A se mantuvo después de ajustar el análisis por 100,000 permutaciones (OR: 2.38, 95% IC 1.65-3.38,  $p= 0.0143$ ). El genotipo homocigoto AA para este SNP estuvo ausente en los 490 los individuos analizados, por lo que no fue posible evaluar su participación en la susceptibilidad a asma en estado homocigoto.

Por otra parte, no se observó evidencia de asociación del SNP-238 G/A con asma (OR: 1.14 IC 0.63-2.06,  $p= 0.69$ ). El genotipo homocigoto para este SNP fue detectado sólo en un caso y un control.

El análisis de estratificación por género, reveló al alelo -308A como un factor de riesgo para desarrollar asma únicamente en mujeres (OR= 4.04, 95% IC 1.55-10.73,  $p= 0.0009$ ). El polimorfismo -238G/A (rs1800629) no mostró asociación con asma en ningún género (Tabla 9).

Las frecuencias alélicas de los polimorfismos -308G/A y -238G/A documentadas en el grupo de controles sanos fue similar a la reportada por otros grupos para la población mexicana (Zúñiga y cols., 2001, Rodríguez-Carreón y cols., 2005). Sin embargo, las frecuencias del alelo -308A difieren significativamente de aquellas obtenidas para otras poblaciones como USA, Italia, España; Korea, India, Gambia, etc., (Jiménez-Morales y cols., 2009).

**Tabla 8. Análisis comparativo entre casos y controles de SNPs en el gen *TNF $\alpha$* .**

SNP	Población	MAF	OR [95%IC]	P*	Ajustado por ancestría	
					OR [95%CI]	P**
<b>-308</b>						
	Controles	0.29				
	Casos	0.6	<b>2.32 [1.28-4.20]</b>	<b>0.002*</b>	<b>2.38[1.65-3.38]</b>	<b>0.0143</b>
<b>-238</b>						
	Controles	0.04				
	Casos	0.05	1.14 [0.63-2.06]	0.69	1.42 [0.96-2.10]	0.40

MAF: frecuencia del alelo menor, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, \*: se mantiene la P significativa después de la corrección por Bonferroni ( $p= 0.004$ ), P\*\* valores ajustados por ancestría usando un modelo dominante. La letra negrita muestra los valores con significancia estadística.

**Tabla 9. Análisis comparativo del alelo *TNF- $\alpha$ -308A* entre géneros.**

Género	Población	MAF	OR 95%CI	P
<b>Femenino</b>	Controles	0.02		
	Casos	0.078	<b>4.16 [ 1.58 - 11.23]</b>	<b>0.0008</b>
<b>Masculino</b>	Controles	0.04		
	Casos	0.06	1.53 [ 0.71- 3.29]	0.23

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

ii) Interleucina 13: *IL13*

En este gen se realizó el análisis de cuatro polimorfismos, dos de ellos localizados en la región 5'UTR (rs1881457 A/C, rs1800925 C/T) y los otros dos en la región codificante (rs20541 T/C y rs1295685 T/C) (Fig. 16). Los polimorfismos rs1881457 y rs1800925 se encontraron en estrecho LD ( $D' > 90$ ), por lo que la distribución de sus genotipos fue muy similar. Los alelos C y T de ambos SNPs mostraron una mayor frecuencia en casos comparado con los controles (rs1881457:  $p = 0.009$ , OR 1.38, 95% IC 1.07-1.7; rs1800925:  $p = 0.05$ , OR 1.32, 95% IC 1.02-1.7) (Tabla 10). El análisis de genotipo mostró que el alelo C del rs1881457 en estado homocigoto incrementa el riesgo a asma (OR 2.02, 95% IC 1.1-3.73,  $p = 0.018$ ) (Tabla 11). Por otro lado, aunque los alelos C de los SNPs rs20541 y rs1295685 también se encontraron con mayor proporción en casos que en controles, las diferencias en su distribución no fueron estadísticamente significativas (rs20541: 39 vs 36,  $p = 0.22$  y rs1295685: 40 vs 36,  $p = 0.16$ , respectivamente). Al estratificar por género ninguno de los 4 SNPs reveló asociación con asma.

El análisis de haplotipos incluyendo todos los SNPs de *IL13* permitió identificar 8 haplotipos con una frecuencia mayor al 1%, de los cuales 6 mostraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles (ACCC:  $p = 0.02$ , CTTT:  $p = 0.04$ , ACCT:  $p = 6.60E-007$ , ACTC:  $1.00E-004$ , CTCC:  $p = 0.0025$  y CTTC:  $p = 0.004$ ), aunque únicamente los últimos cuatro mantuvieron esta significancia después del análisis con 100,000 permutaciones. De estos, tres haplotipos confirieron protección a asma (ACCT: OR= 0.1, 95% IC 0.02-0.42,  $p = 0.00001$ ; ACTC: OR= 0.01, 95% IC 0.02-0.438,  $p = 0.001$  y el CTCT: OR= 0.17, 95% IC 0.03-0.73,  $p = 0.025$ ), mientras que el haplotipo que contenía todos los alelos de riesgo, CTCC, evidenció un OR de 3.05 (95% IC 1.41-6.69) (Tabla 12). Así mismo, el análisis de LD mostró que estos SNPs se segregan en dos bloques ( $LD > 80\%$ ), uno conformado por los SNPs localizados en la región 5'UTR (rs1881457,



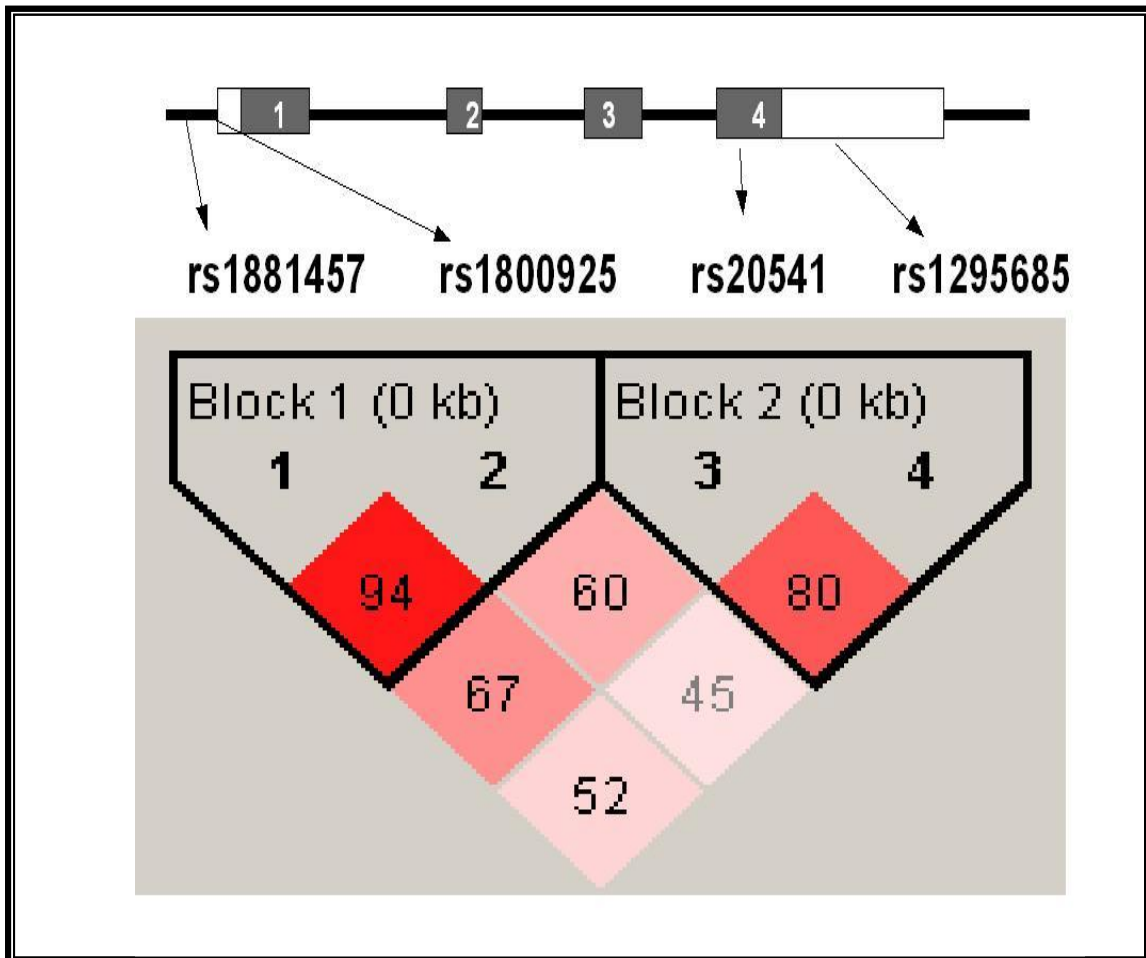


Figura 16. Gen *IL13*: Estructura del gen y localización de SNPs incluidos en este estudio. Los exones son representados por cuadros, los cuadros blancos son regiones no traducibles. b) valores de desequilibrio de ligamiento (LD) entre los SNPs analizados, se identifican dos bloques con LD >80.

**Tabla 10. Análisis comparativo entre casos y controles de SNPs en el gen *IL13*.**

SNP	Región de <i>IL13</i>	Alelo mayor/menor	MAF		OR[95% IC]	P	p*
			Contr.	Casos			
rs1881457	5'UTR	A/C	0.25	0.32	1.38 [1.07-1.7]	<b>0.009</b>	<b>0.050</b>
rs1800925	5'UTR	C/T	0.26	0.31	1.32[1.02-1.7]	<b>0.025</b>	0.138
rs20541	exón 4	T/C	0.36	0.39	1.32[1.04-1.68]	0.22	0.84
rs1295685	3'UTR	C/T	0.36	0.4	1.38 [1.42-1.94]	0.16	0.72

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.

**Tabla 11. Análisis del SNP rs1881457 en el gen *IL13*.**

rs1881457	Frecuencia		OR [95% IC]	P
	Controles	Casos		
Genotipo				
AA	0.56	0.46		
AC	0.38	0.44		<b>0.03</b>
CC	0.06	0.10		
AA vs AC			1.35[0.097-1.88]	0.074
AA vs CC			<b>2.02[1.11-3.73]</b>	<b>0.018</b>

OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, La letra negrita muestra los valores con significancia estadística.

**Tabla 12. Análisis comparativo entre casos y controles de haplotipos del gen IL13.**

Haplotipo (rs1881457, rs1800925, rs20541, rs1295685)	Frecuencia		OR[95% IC]	P	P*
	Controles	Casos			
ACTT	0.36	0.33	0.85 [0.67-1.09]	0.17	0.75
ACCC	0.27	0.32	<b>1.29 [1.01-1.66]</b>	<b>0.02</b>	0.2
CTTT	0.2	0.25	<b>1.40 [1.07-1.83]</b>	<b>0.04</b>	0.23
ACCT	0.06	0.004	<b>0.1 [0.02-0.42]</b>	<b>6.60E-007</b>	<b>1.00E-005</b>
ACTC	0.04	0.004	<b>0.1 [0.02-0.43]</b>	<b>1.00E-004</b>	<b>0.001</b>
CTCC	0.01	0.04	<b>3.05 [1.41-6.69]</b>	<b>0.002</b>	<b>0.01</b>
CTCT	0.02	0.003	<b>0.17 [0.03-0.73]</b>	<b>0.004</b>	<b>0.025</b>
ATCC	0.01	0.01	1.34 [0.41-4.27]	0.61	0.99

Haplotipos con frecuencias < 0.01 no se muestran; OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza; P\*: valores de p después de 100,000 permutaciones. La letra negrita muestra los valores con significancia estadística.

rs2274755 y rs1800925) y el otro por los SNPs localizados en la región codificante (rs20541, rs1295685) (Fig. 16b). Así mismo, el haplotipo CC del bloque 1, que contiene el alelo de riesgo del SNP rs1881457 y el alelo ancestral de rs1800925, fue identificado como de alto riesgo (OR: 6.04, 95% IC 1.53-27.76,  $p=0.0022$ ).

Con respecto al bloque 2, el haplotipo que contiene los alelos de riesgo de los SNPs rs20541 y rs1295685 (CC), confiere un OR de 1.53 (95% IC 1.2-1.95,  $p=0.004$ ), mientras los haplotipos que contienen un alelo ancestral y uno de riesgo (TC o CT), los cuales se presentaron en mayor proporción en controles que en casos (7% vs 1% y 7% vs 0.05%, respectivamente) mostraron un efecto protector (TC: OR 0.17, 95% IC 0.07-0.42,  $p=0.0001$  y CT: OR: 0.06, 95% IC 0.01-0.24  $p=0.00001$ , respectivamente), aún después de corregir los datos con 100,000 permutaciones.

### iii) Metaloproteasa 9: *MMP9*

El análisis de los SNPs rs3918247 T/C, rs25650 G/C, rs2274755 G/T, rs17576 A/G, rs6017725 T/C, rs6104428 A/G y rs2274756 G/A reveló que los polimorfismos rs25650, rs6017725 y rs6104428 no fueron polimórficos en las muestras analizadas, dado que no se detectó el alelo de riesgo en ninguno de los 690 individuos analizados. Cuando se compararon las frecuencias alélicas de los cuatro SNPs polimórficos rs3918247, rs2274755, rs17576 y rs2274756 entre casos y controles, tres de ellos mostraron diferencias estadísticamente significativas, sugiriendo que estos se encuentran asociados a la susceptibilidad para desarrollar asma con un OR de 1.43 para el rs3918247 (95% IC 0.97-2.1,  $p=0.05$ ), de 2.39 para el rs2274755 (95% IC 1.3-4.41,  $p=0.002$ ) y 2.32 para el rs2274756 (95% IC 1.26-4.24,  $p=0.003$ ). Únicamente los dos últimos SNPs permanecieron con diferencias significativas entre casos y controles después del análisis con 100,000 permutaciones ( $p=0.03$  para ambos) (Tabla 13).

El análisis de haplotipos mostró un fuerte LD entre los 4 SNPs informativos ( $D'>94$ ) (Fig. 17b), de hecho este fue del 100% ( $r^2=1$ ) entre los polimorfismos

**Tabla 13. Análisis comparativo entre casos y controles de SNPs en el gen *MMP9*.**

SNP	Región de <i>MMP9</i>	Alelo mayor/ menor	MAF		OR[95% IC]	P	p*
			Contr.	Casos			
rs3918247	5'UTR	T/C	0.2	0.26	1.43 [0.97-2.1]	<b>0.05</b>	0.26
rs25650	exón 3	G/C	0	0	--	--	--
rs2274755	intrón 4	G/T	0.05	0.11	2.39 [1.3-4.41]	<b>0.002</b>	<b>0.03</b>
rs17576	exón 6	A/G	0.24	0.4	1.36 [0.92-2.01]	0.11	0.48
rs6017725	exón 9	T/C	0	0	--	--	--
rs6104428	exón 11	A/G	0	0	--	--	--
rs2274756	exón 12	G/A	0.05	0.11	2.32 [1.26-4.24]	<b>0.003</b>	<b>0.03</b>

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.

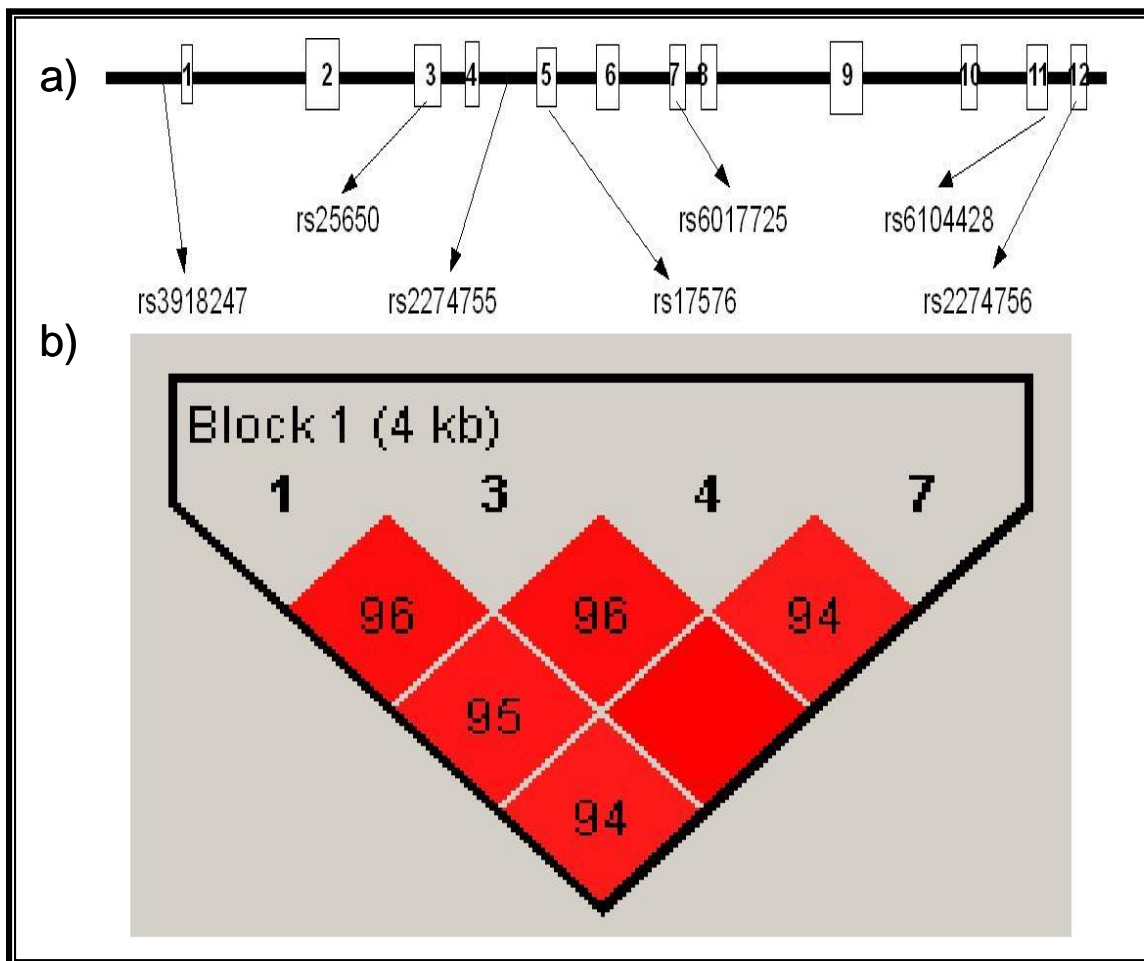


Figura 17. Gen *MMP9*: a) Estructura del gen y localización de SNPs incluidos en este estudio. Los exones son representados por cuadros. b) valores de desequilibrio de ligamiento (LD) entre los SNPs analizados. Se identifica un bloque con LD >90.

rs2274755 y el rs2274756. Así mismo, en la población analizada, únicamente se documentaron tres haplotipos con frecuencias mayores a 1%: TGAG, CGGG y CTGA. El haplotipo CTGA, el cual contiene todos los alelos de riesgo, se presentó en mayor proporción en el grupo de pacientes que en los controles (10% vs 4%,  $p=0.001$ ), lo que sugiere que este haplotipo confiere riesgo para desarrollar asma (OR 2.59, 95% IC 1.39-4.81,  $p=0.0009$ ). Después del análisis con 100,000 permutaciones se mantuvo la significancia estadística para el haplotipo de riesgo ( $p=0.002$ ) (Tabla 14).

### VI.2.3 Identificación de nuevos polimorfismos.

La búsqueda de nuevos SNPs se realizó en las regiones codificantes de los genes *CHRM2* y *CHRM3* mediante secuenciación automática. En las bases de datos electrónicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), se reportan cuatro SNPs en *CHRM2* y dos en *CHRM3*, localizados en sus regiones codificantes. En este análisis no se identificaron polimorfismos para ambos genes en 200 individuos analizados (100 casos y 100 controles), únicamente documentamos la presencia del SNP rs8191992 T/A, el cual se localiza dentro de la región 3'UTR (Fenech y cols., 2001) (Fig. 18)

### VI.2.4 Identificación de nuevos genes candidato

Para la identificación de genes nuevos candidato se analizaron un total de 250 individuos, 130 casos y 120 controles mediante microarreglos (Affy V6.0) (Fig. 19), obteniendo una eficiencia de genotipificación (*call rate*) >95%. Durante el análisis de datos se incluyeron sólo aquellos marcadores en los que se obtuvo confiabilidad en al menos el 95% de los genotipos, se encontró una distribución de los genotipos en HWE en los controles ( $p < 10E-8$ ) y cuyos alelos menores estuvieron en una frecuencia >0.01. Después de aplicar estos filtros de calidad, 780,000 SNPs fueron útiles para el estudio de asociación. En el análisis bajo un

**Tabla 14. Análisis comparativo entre casos y controles de haplotipos del gen *MMP9*.**

Haplotipo (rs3918247, rs2274755, rs17576, rs2274756)	Frecuencia		OR[95% IC]	P	P*
	Controles	Casos			
TGAG	0.79	0.73	<b>0.7 [0.48-1.0]</b>	<b>0.05</b>	0.25
CGGG	0.15	0.14	0.95 [0.59 -1.5]	0.74	0.999
CTGA	0.04	0.1	<b>2.59 [1.39-4.81]</b>	<b>0.001</b>	<b>0.027</b>

Haplotipos con frecuencias < 0.01 no se muestran; OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza; P\*: valores de p después de 100,000 permutaciones. La letra negrita muestra los valores con significancia estadística.



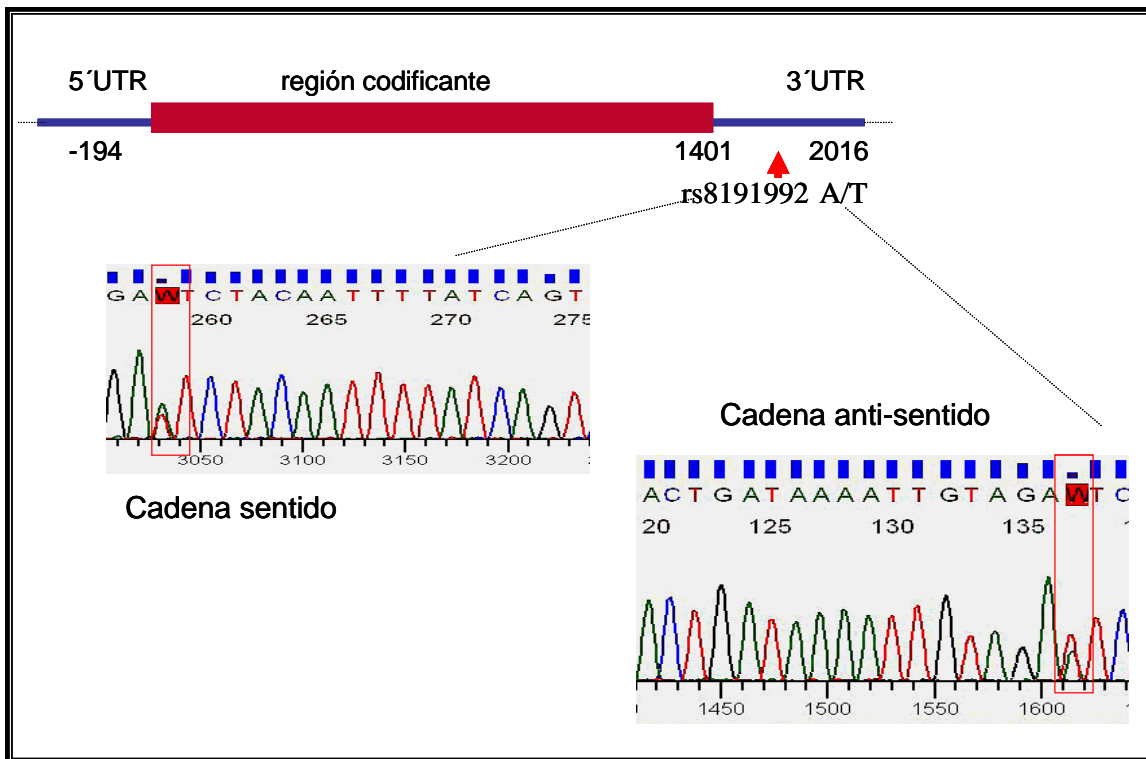


Fig. 18. SNP rs8191992. Electroferograma de la secuenciación de un paciente heterocigoto A/T.

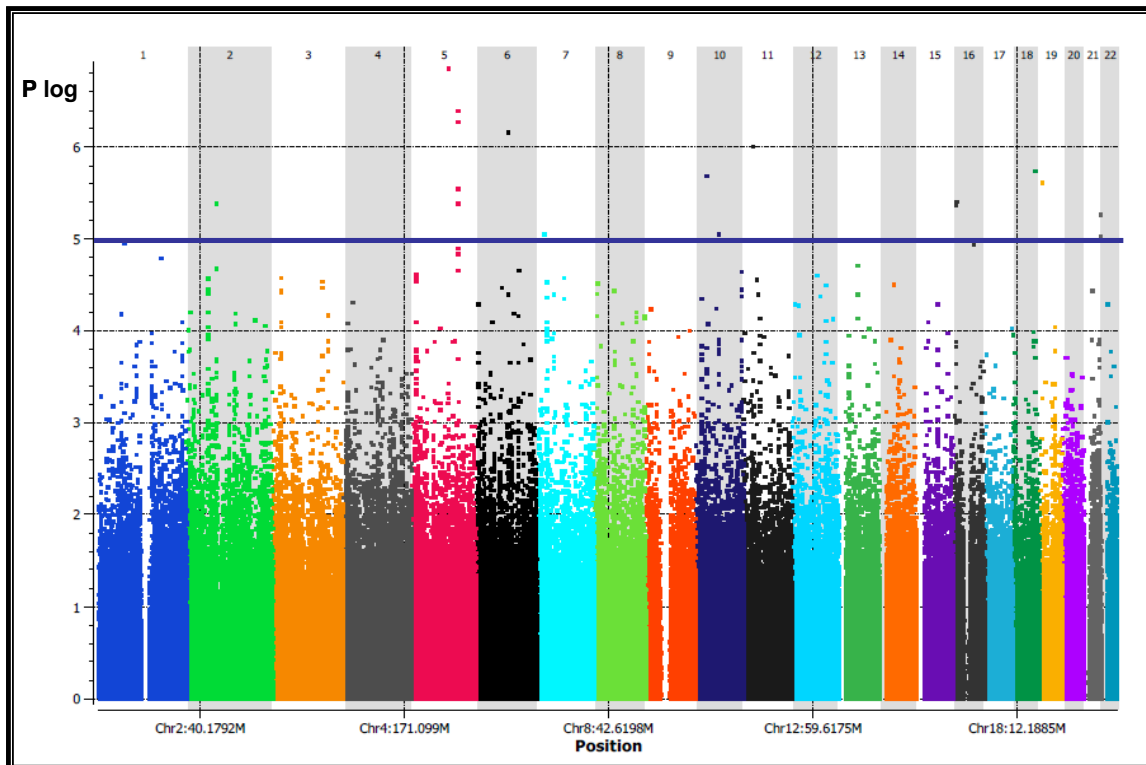


Figura 19: Plot del  $-\log_{10}$  del valor de P organizado por cromosoma. Los SNPs con valor sugestivo de asociación se ubican por arriba de la línea azul.

modelo aditivo, un total de 17 SNPs mostraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles ( $p < 9.3262E-6$ ). Cuatro de estos SNPs se localizan en el cromosoma 5q23.3 y sugieren al gen *ADAMTS19* (del inglés *a Disintegrin and metalloproteinase domain, with thrombospondin type-1 modules*) como un gen candidato para asma (Tabla 15), cabe mencionar que este patrón también se detectó cuando se realizó el análisis bajo un modelo dominante. Así mismo, el modelo recesivo arrojó diferencias estadísticamente significativas ( $p < 9.61 \times 10^{-6}$ ) en la distribución de 6 polimorfismos ubicados en la región 11q24.2, tres de los cuales se localizan en el gen *ETS1* (del inglés *v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*).

En resumen, en la presente tesis se analizaron 29 genes candidato, de los cuales variantes alélicas en nueve de ellos presentaron asociación con asma. Cinco de estos genes (*CHRM2*, *STAT1*, *PDCD1*, *ADRB2* y *CHRM3*) se identifican por primera vez como factores de riesgo para a desarrollar la enfermedad y se replicaron los resultados descritos en otras poblaciones para los genes *TNF $\alpha$* , *IL13* y *MMP9*. Así mismo, mediante el análisis de microarreglos se identificaron dos potenciales genes candidato para asma (*ADAMT19* y *ETS1*).

**Tabla 15. SNPs que mostraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de microarreglos.**

Modelo	Cromosoma	Citobanda	rs	Gen	P
Aditivo	5	q23.3	rs12513998	?	3.97E-007
			rs13153828	<i>ADMATS19</i>	5.26E-007
			rs15514002	<i>ADAMTS19</i>	2.86E-007
			rs17618197	<i>ISOC1</i>	4.08E-007
Recesivo	11	q24.2	rs1893167	?	5.61E-007
			rs6590290	?	2.14E-006
			rs4497423	<i>ETS1</i>	2.14E-006
			rs1940745	<i>ETS1</i>	2.14E-006
			rs7116628	?	2.26E-006
			rs10873215	<i>RAD51L</i>	8.31E-006
			rs12795392	<i>ETS1</i>	9.61E-006

*ADAMTS19*: Disintegrina y metaloproteínasa con un dominio de trombospodina 19, *ETS1*: homólogo 1 del oncogen E26 del virus v-ets de erythroblastosis, *ISOC1*: del inglés "isochorismatase domain containing 1", *RAD51L*: parecido al homólogo RAD51 (RecA homolog, E. coli)

## **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.

En el presente trabajo se muestra un análisis extenso de asociación de SNPs localizados en genes que participan en la regulación de los procesos inflamatorios e inmunes (*IL4*, *IL4R*, *IL13*, *TNF $\alpha$* , *IL10*, *IL12B*, *IL18*, *FCER1 $\beta$* , *RANTES*, *PDCD1*, *CTLA4*, *STAT1*, *STAT4*, *STAT6*, *DPP10*, *TNFR1*, *CD14*, *VDR*, *SPINK5*, *RAD50*, *GATA3*, *FCRL3* y *GM-CSF2*), en la contracción del músculo liso (*CHRM1*, *CHRM2*, *CHRM3* y *ADRB2*) y en la remodelación de tejido (*MMP9* y *TIMP1*).

Debido a que la distribución de algunos polimorfismos puede variar dependiendo del origen étnico de las poblaciones y dada la diversidad en la composición racial que caracteriza a la población mexicana, el análisis de ancestría en nuestra muestra fue fundamental. En este estudio se incluyeron 10 AIMs para descartar estratificación de la población, los cuales fueron validados previamente en estudios de asociación en pacientes mexicanos con diabetes mellitus tipo 2 (Martinez-Marignac y cols., 2007; Villarreal-Molina y cols., 2007). Los resultados derivados de este análisis, mostraron frecuencias similares entre casos y controles en nueve de los AIMs incluidos, evidenciando que las poblaciones analizadas en este trabajo tenían un origen étnico similar y por lo tanto se descartó la presencia de falsas asociaciones por estratificación de la muestra. A diferencia de las poblaciones cuacásica, africana y asiática incluidas en el proyecto del HapMap Internacional, el análisis de ancestría en las muestras de estudio no reveló ningún marcador ancestral característico (Fig. 13), lo que sustenta observaciones previas sobre la gran heterogeneidad genética de la población mexicana derivada de la mezcla de razas, donde los genes nativos americanos contribuyen en el 51%, los europeos con el 45.4% y los africanos con el 3.7% (Linsker, 1998; Choudhry y cols., 2006). Cabe señalar que en los análisis de ancestría, es una observación frecuente encontrar diferencias significativas en la distribución de alelos de algunos AIMs, como fue el caso del marcador rs3340 ( $p= 0.0169$ ) en la población de estudio; de hecho este abordaje ha sido utilizado

para la identificación de nuevos genes candidato. De manera interesante, el SNP rs3340 se localiza en el intrón 2 del gen que codifica para la proteína semejante a la proteína asociada alfa-Sin3A (*SAP30L*), que se expresa abundantemente en tejidos de origen hematopoyético y del que se derivan las células implicadas en los procesos inflamatorios e inmunes (Viiri y cols., 2006). Además, aunque se conoce poco de la función de *SAP30L*, se propone que tanto esta proteína como *SAP30* por su actividad de desacetilasas de histonas, regulan los procesos de transcripción de varios genes (Viiri y cols., 2009). Sin embargo antes de sugerir a *SAP30L* como nuevo gen candidato es asma, es necesario considerar que el SNP rs3340 puede estar en LD con SNPs localizados en genes aledaños. De hecho, en el locus de *SAP30L*, 5q31, se encuentran los loci de por lo menos 7 genes que han dado evidencias de asociación con asma en más de cinco estudios independientes, como *IL13*, *IL4*, *CD14*, *SPINK5*, *ADRB2*, *HAVCR1* y *LTC45* (Vercelli, 2008). Cualquier hipótesis debe ser confirmada mediante el análisis de otros SNPs del gen *SAP30L* y la construcción de haplotipos entre éstos y SNPs localizados en genes aledaños.

Para determinar si SNPs en genes que previamente se han asociado a asma en otras poblaciones o cuyos productos tienen una función relevante en el sistema inmune son factores de riesgo genético en la población mestiza mexicana, se realizó un estudio de asociación de casos y controles donde se incluyeron 93 SNPs localizados en 29 genes candidato. Los SNPs seleccionados fueron algunos que habían documentado asociación con asma en otras poblaciones y otros que se localizan en genes que han dado evidencia (usando ratones knockout o evaluando su expresión en esputo de pacientes asmáticos) de tener implicaciones importantes en la patogénesis de la enfermedad. Así mismo, para identificar nuevos SNPs y nuevos genes involucrados en el desarrollo de esta entidad, realizamos un análisis de secuenciación de las regiones codificantes de los genes *CHRM2* y *CHRM3* y un estudio de microarreglos de ADN.

En el análisis de genes candidato se identificaron polimorfismos en 20 genes cuyas frecuencias alélicas o genotípicas no mostraron evidencia de asociación con

asma (Tabla 3) y nueve genes en donde se identificó asociación entre algunos SNPs o genotipos con esta entidad, documentándose asociación con los genes *TNF $\alpha$* , *IL13* y *MMP9*, previamente descritos en otras poblaciones y con los genes *CHRM2*, *STAT1*, *PDCD1*, *GATA3*, *ADRB2* y *CHRM3* por primera vez asociados con el riesgo a padecer la enfermedad.

Los resultados derivados de este estudio sugieren que algunos factores genéticos involucrados en el desarrollo del asma son diferentes a los descritos en otras poblaciones, ya que cuando se compararon las frecuencias alélicas de SNPs localizados en los genes *IL4*, *IL4R*, *IL10*, *IL12B*, *IL8*, *FCER1 $\beta$* , *RANTES*, *CTLA4*, *STAT4*, *STAT6*, *DPP10*, *TNFR1*, *VDR*, *CDI4*, *TIMP1*, *SPINK5*, *RAD50*, *CHRM1*, *FCRL3*, *GM-CSF2* no se documentó asociación incluso en genes cuya asociación con asma se han replicado en por lo menos 5 estudios realizados en diferentes poblaciones (*IL4*, *FCR1B*, *IL4R*, *IL10*, *RANTES* y *CTLA4*) (Vercelli, 2008). Los resultados anteriores pueden ser el reflejo de la presencia de importantes diferencias étnicas en las variantes alélicas que confieren susceptibilidad a la enfermedad y apoyan la aseveración de que asociaciones observadas en una población determinada no pueden ser extrapoladas a otras. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que otros SNPs localizados en estos genes, tengan un efecto relevante no solamente confiriendo susceptibilidad, sino modificando el curso clínico (modificadores) de la enfermedad. Para confirmar esta hipótesis se deberá desarrollar un estudio de correlación entre la presencia de los alelos de riesgo y las características clínicas de los pacientes asmáticos, análisis que requiere de un mayor número de muestra que el incluido en la presente tesis.

Uno de los genes en los que se deberá poner atención es *IL10*, ya que aunque en este estudio no mostró evidencia de asociación con asma, está involucrado en el metabolismo de broncodilatadores y antiinflamatorios, los principales fármacos que figuran en el esquema de tratamiento de los pacientes asmáticos. Los SNPs de importancia deberán ser -1082G/A (rs1800896), -819C/T (rs1800871) y -592C/A porque las evidencias apuntan a que pueden influenciar la expresión de ésta proteína proinflamatoria, la cual juega un papel importante en la



regulación de la respuesta Th2 (Chatterjee y cols., 2005; Kim y cols., 2009; Lacy y cols., 2009). De hecho, se ha reportado una asociación entre los niveles de IL10 en suero y la respuesta a fármacos dirigidos a inhibir a los leucotrienos como el montelukast y la correlación entre el alelo -819T y niveles incrementados de IgE total en suero (Stelmach y cols., 2002). El SNP -592C/A no fue incluido en el presente estudio ya que se encuentra en alto LD con el -819C/T (Karjalainen y cols., 2003; Chatterjee y cols., 2005).

Otro gen de especial interés es *ADR $\beta$ 2*, quizá uno de los genes más investigados en los estudios de asociación entre polimorfismos y asma. Más de 40 reportes, describen una asociación de los SNPs Arg16Gly (rs1042713) y Gln27Glu (rs1042714) con la gravedad y la respuesta a los  $\beta_2$  agonistas en el asma, particularmente el SNP Gly16 (Martínez y cols., 1997; Contopoulos-loannidis y cols., 2007; Finkelstein y cols., 2009). Las frecuencias alélicas de Arg16 y Glu27 detectadas en este análisis, fueron muy similares entre casos y controles (43.7 vs 46.9%,  $p= 0.4207$  y 4.9 vs 4.2%,  $p= 0.7848$ , respectivamente), sin embargo, dado que la distribución del genotipo homocigoto Glu27Glu (rs1042714) reveló un OR de 4.37 (95% IC 1.206-15.9,  $p= 0.01529$ ), se sugiere que el alelo Glu27 en estado homocigoto confiere riesgo para desarrollar asma en niños mexicanos. Estos datos, difieren de lo reportado por Santillán y cols., (2003), quienes analizaron pacientes adultos mexicanos con asma y reportaron que el alelo Glu27 tiene un efecto protector. Otros autores han analizado la participación del alelo Arg16 en la gravedad del asma tanto en adultos como en niños mexicanos, sin embargo los resultados también son controversiales (Santillán y cols., 2003; Burchard y cols., 2004; Choudhry y cols., 2005).

De los polimorfismos asociados a asma que se describen en esta tesis (Tablas 4, 7, 8, 10, 13), es la primera vez que se identifican SNPs en los genes *CHRM2*, *STAT1*, *GATA3*, *PDCD1* y *CHRM3* como factores genéticos de riesgo para desarrollar la enfermedad, estos tres últimos sólo revelaron un efecto de riesgo cuando se analizaron los genotipos homocigotos.

A la fecha, se han publicado tres análisis de polimorfismos en el gen *CHRM2* y su asociación con asma en poblaciones caucásica y asiática y ninguno de ellos sugiere la participación de este gen en la susceptibilidad a padecerla (Fenech y cols., 2001, Yamamoto y cols., 2002, Szczepankiewicz y cols., 2009). En contraste, con estos estudios, el análisis comparativo de las frecuencias alélicas y genotípicas entre pacientes y controles y después de 100,000 permutaciones, reveló asociación con 4 SNPs localizados en las secuencias no codificantes del gen *CHRM2* (Tabla 4). Aunque aún no existen estudios funcionales de estos SNPs incluidos, dada su localización (regiones reguladoras 5' y 3' UTR), es posible que alteren sitios de interacción con factores de transcripción o modifiquen la estabilidad del mRNA, lo que en ambos casos afectaría los niveles de expresión del receptor (Costello y cols., 1998; Fenech y cols., 2004). Bajos niveles del *CHRM2* conducirían a una liberación excesiva de acetilcolina, resultando en una actividad incrementada de *CHRM3* sobre el músculo liso y en consecuencia mayor broncoconstricción de las VA. Este fenómeno se ha observado en presencia de proteínas inflamatorias, PBC de eosinófilos, la cual inhibe la interacción de *CHRM2* con la acetilcolina; de hecho, la PBC es muy abundante en las VA de pacientes asmáticos (Durcan y cols., 2006).

El análisis del gen *CHRM3* reveló que el haplotipo AGACTTC, el cual contiene todos los alelos de riesgo confiere un OR de 2.24 ( $p= 0.0288$ ). Este gen se ha investigado poco desde el punto de vista genético, hasta donde sabemos se han realizado sólo 3 estudios en este sentido y ninguno de ellos ha documentado asociación con asma (Fenech y cols., 2001, Yamamoto y cols., 2002; Donfack y cols., 2003). Sin embargo existen reportes que señalan la participación relevante de *CHRM3* en la patogénesis del asma (Donfack y cols., 2003; Fisher y cols., 2004; Durcan y cols., 2006). De hecho Fisher y cols., (2004) observaron que ratones knockout *M3*<sup>-/-</sup> no desarrollan HRB después de que son tratados con acetilcolina.

En el análisis de secuenciación de las regiones codificantes de los genes *CHRM2* y *CHRM3* reveló que estas regiones están altamente conservadas, dado

que no se identificaron variaciones en sus secuencias, incluyendo SNPs que se reportan en bases de datos publicas con una heterocigocidad de 0.379, como el rs2067481 del gen *CHRM3* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>). Dada la conservación de estas regiones, la presencia de polimorfismos en ellas podrían contribuir a la etiología del asma o influir en la respuesta al tratamiento, ya que los anticolinérgicos utilizados en el manejo de ésta enfermedad, son competidores de los ligandos de los receptores tipo muscarínicos (Fenech y Hall, 2002). En contraste, estos genes contienen múltiples polimorfismos en sus secuencias no codificantes, los que podrían alterar los niveles de su expresión. De hecho, en el presente análisis documentamos la presencia del SNP rs8191992, una sustitución de A/T en la región 3'UTR del gen *CHRM2*, el cual mostró asociación con asma (Fenech y cols., 2001) (Fig. 18).

Así mismo, al comparar la estructura y frecuencia de los haplotipos identificados en las muestras estudiadas con el de otras poblaciones, se observaron diferencias importantes. En la población mexicana el análisis de haplotipos evidenció un fuerte LD con los 7 SNPs incluidos se generaron tres bloques de 6 haplotipos cada uno con frecuencias mayores a 1%, mientras que en otras poblaciones (dependientes de alcohol), se reportaron 10 con frecuencias mayores al 1% y valores distintos de LD. Por ejemplo la  $D'$  entre rs978437 y rs6792027 en la población analizada fue de 75, mientras que en un grupo de individuos euroamericanos y afroamericanos ésta fue de 56 y 31, respectivamente (Wang y cols., 2004).

La proteína STAT1 es un transductor de señales y activador de la transcripción que está involucrado en distintos procesos inflamatorios a través de la activación de otros factores de transcripción como  $IFN\gamma$  y FOXP3 (Hattori y cols., 2007; Ouaked y cols., 2009). Sin embargo a pesar de las evidencias experimentales que señalan a *STAT1* como un gen candidato importante para asma y fenotipos relacionados, sólo se ha realizado un estudio de asociación entre SNPs en este gen y atopía (Pinto y cols., 2007). En dicho análisis, Pinto y cols., (2007), incluyeron 3099 niños alemanes y sugieren que el SNP rs3771300 puede

proteger a sensibilización atópica. En el presente estudio, únicamente dos de los ocho SNPs analizados, rs2280234 (intrón 15) y rs2030171 (intrón 5), mostraron asociación con susceptibilidad al asma y de manera interesante, ambos se localizaron en dos bloques distintos de haplotipos (Fig. 15). Los ocho SNPs incluidos en este estudio se localizan en regiones no codificantes y dado el comportamiento de los haplotipos, es probable que la asociación que observamos se deba a un LD entre los SNPs identificados y otros localizados en regiones UTR del mismo gen o en genes cercanos a *STAT1*. Aledaños a *STAT1* se localizan los genes glutaminasa (*GLS*) y *STAT4*. *GLS* se expresa en epitelio de las VA y se propone que puede ser relevante en la fisiopatología de la inflamación aguda de las VA de los pacientes asmáticos (Hunt y cols., 2002). Por su parte, *STAT4* juega un papel importante en la respuesta inmune Th1, de hecho los ratones knockout para este gen desarrollan un fenotipo inmune predominantemente de tipo Th2, aunque los resultados de dos SNPs analizados en este estudio no sugieren que variantes alélicas en este gen sean un factor de riesgo para asma (Park y cols., 2005; Pykäläinen y cols., 2005).

Con relación a los genotipos de los genes *GATA3* y *PDCD1*, los homocigotos (AA) de los SNPs rs1269486 (*GATA3*) y rs10204525 (*PDCD1*) mostraron ORs de riesgo de 5.04 y 2.39, respectivamente. Hasta el momento, no existen reportes de asociación entre SNPs en ambos genes y asma, solamente un estudio reciente ha reportado que el SNP rs1269486 del gen *GATA3* es un factor de riesgo para rinitis alérgica en población china (Wang y cols., 2008; Suttner y cols., 2009). Este SNP se localiza en la región 3'UTR del gen *GATA3* y se sugiere que la presencia del alelo A puede estar asociado a una mayor estabilidad del mRNA, lo que podría conducir a niveles incrementados de la proteína y por consecuencia a la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias tipo Th2 (IL4, IL5 e IL13) y a la inhibición de factores específicos de células Th1 (Zhu y cols., 2006). Se ha demostrado que una respuesta inmune dominada por *GATA3* es esencial para la HRB, de hecho el tratamiento con moléculas antisentido dirigidas a bloquear la actividad de esta proteína, disminuye la gravedad de la respuesta

alérgica de las VA, por lo que es posible que pacientes homocigotos para el alelo de riesgo, sean candidatos al tratamiento anti-GATA3 (Yamashita y cols., 2006).

Por su parte el alelo A del rs10204525 de *PDCD1* también podría modificar la estabilidad del mRNA. Este gen codifica para una molécula co-estimuladora que se expresa en linfocitos T y B activados y ha sido asociado con homeostasis inmune y autoinmunidad. Datos recientes demuestran que *PDCD1* previene la proliferación incontrolada de células T autoreactivas (Keir y cols., 2007). A la fecha, no se había determinado la participación de SNPs en *PDCD1* en la susceptibilidad a asma, pero las evidencias de asociación con algunas de sus variantes alélicas y entidades inmunes e inflamatorias como artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico (LES), incluyendo niños mexicanos con LES (Velázquez-Cruz y cols., 2007); aunado a la participación de esta molécula coestimuladora en la respuesta inmune del asma, sugieren que *PDCD1* es un importante gen candidato que no debe ser excluido en estudios de asociación, de correlación genotipo-fenotipo o de interacción génica para determinar su participación en la patogénesis de esta enfermedad respiratoria.

Otro de los genes que ha mostrado tener importantes implicaciones en la etiopatogenia del asma es *TNF $\alpha$* . La participación de TNF en los procesos de remodelación del tejido, permeabilidad de la barrera epitelial, activación de macrófagos, reclutamiento de células proinflamatorias, efectividad en la respuesta inflamatoria local y sistémica, etc., (Babu y cols., 1997), aunado a los estudios funcionales que indican que el alelo -308A tiene un efecto funcional en la sobreexpresión del gen (Wilson y cols., 1997), apoyan la importante participación de esta citocina en la fisiopatología del asma y los resultados de asociación entre el alelo -308A y asma encontrados en el este proyecto (Tabla 8). El alelo -308A como factor de riesgo para asma ya se ha reportado en pacientes mexicanos y en un gran número de poblaciones analizadas, sin embargo, en ninguno de ellos se ha documentado una asociación dependiente del género (Wu y cols., 2007; Vercelli, 2008). En este estudio, el análisis del polimorfismo -308 G/A por género reveló que este alelo no se asocia a asma en hombres y que el riesgo que confiere

el alelo A para padecer asma que se obtuvo durante el análisis de casos y controles, está a expensas del grupo de mujeres, con un valor de OR casi dos veces más que en la población total de pacientes (4.04 vs 2.4). Estos hallazgos son apoyados por el estudio de Ono y cols., (2005) quienes al comparar los niveles de  $TNF\alpha$  circulante entre hombres y mujeres, detectaron que las mujeres tenían niveles más altos que los hombres.

Así mismo, el presente análisis confirmó la asociación descrita entre el gen *IL13* y asma en otras poblaciones, ya que aunque no detectamos diferencias significativas en la distribución de uno de los SNPs (rs2054) que se ha asociado a esta entidad en más de 10 estudios independientes, los SNPs localizados en la región promotora, el rs1881457 y el rs1800925 mostraron diferencias significativas entre casos y controles ( $p= 0.009$ ,  $p= 0.025$ , respectivamente) (Tabla 10). *IL13* es una citocina producida por células Th2, cuyo locus se encuentra en una región que ha sido constantemente ligada a asma y fenotipos relacionados (5q31), (Graves y Cols., 2000; Bossé y Hudson 2007; Vercelli, 2008). Esta citocina es capaz de promover una HRB inducida por alérgenos, daño a células epiteliales, hiperplasia de células globosas con hiperproducción de moco y eosinofilia (Wills-Karp y cols., 1998). Se ha evaluado los efectos de la presencia del alelo -1112T en la expresión de *IL13* y tanto en humanos como en modelos animales ha quedado claro que esta variante incrementa los niveles de expresión de esta citocina, lo que podría estimular una respuesta alérgica crónica (Liu y cols., 2003; Cameron y cols., 2006)

En otras poblaciones el rs1800925 (-1112 C/T) se encuentra en LD con el SNP rs20541; sin embargo en nuestro análisis estos SNPs mostraron valores de LD muy bajos, lo cual podría explicar el hecho de que el rs20541 no se encuentre asociado a asma en la población mestiza mexicana (Tabla 10). No obstante, dado que el SNP rs20541 en otras poblaciones se ha asociado con asma, incremento de IgE en suero, atopia y dermatitis atópica, un análisis de asociación entre fenotipos relacionados a asma y este SNP (Vladich y cols., 2005; Cameron y cols., 2006) permitirá determinar su papel en la etiología del asma en niños mexicanos.

Otro de los genes donde también se documentó una fuerte asociación con

asma fue *MMP9* (Tabla 13). MMP-9 es la principal metaloproteasa detectada en fluidos de lavado broncoalveolar y en biopsias obtenidas de pacientes con asma (Matuino y cols., 1997; Oshita y cols., 2003). Esta enzima degrada principalmente colágeno tipo IV y todos los componentes de la matriz extracelular, además contribuye a la migración de células proinflamatorias a través de ella (Bode y cols., 1999; Greenlee y cols., 2006). De este gen, únicamente el polimorfismo rs2274756 se ha analizado en pacientes japoneses, alemanes y australianos con asma, pero sólo se reportó asociación en población japonesa (Nakashima y cols., 2006; Ganter y cols., 2005). La asociación de este polimorfismo es plausible, dado que este SNP conduce a una sustitución de una arginina (R) por una glutamina (Q) en la posición 668 del dominio de interacción con la proteína inhibidora de metaloproteasas 1 (TIMP1), lo que es posible que esta interacción se encuentre afectada y la MMP9 se mantenga constantemente activa, conduciendo a un incremento en la degradación del tejido de las VA.

Los rs26650, rs6017725 y rs6104428 no se encontraron en la población de 690 individuos incluidos en este estudio, por lo que a diferencia de otras poblaciones estos no son polimórficos en población mexicana (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). De los 4 SNPs informativos, sólo 3 (rs3918247, rs2274755 y rs2274756) mostraron diferencias significativas entre casos y controles ( $p= 0.05$ ,  $0.002$  y  $0.003$ , respectivamente). Por otro lado, el análisis de haplotipos formados por las 4 variantes informativas, permitió la identificación de un haplotipo de riesgo CTGA. Parece ser que la interacción de estos alelos en el haplotipo mencionado ejerce un mayor riesgo para padecer asma ( $OR= 2.59$ ,  $p= 0.0009$ ), que cuando los alelos se encuentran en forma independiente ( $OR= 1.43-2.3$ ,  $p= 0.05 - 0.001$ ) (Tabla 14). Cabe aclarar que el valor de  $r^2$  para LD entre los SNPs rs2274755 y rs2274756 fue de uno (Fig. 17), lo que se traduce en que ambos SNP están ligados en un 100%, por lo que al analizar cualquiera de estos SNPs se puede deducir el otro ("tag SNP"). El SNP rs2274755 se localiza dentro del intrón 4 por lo que posiblemente no esté ejerciendo ningún efecto sobre la función del gen y es probable que la asociación mostrada con asma, se deba en

realidad a que este polimorfismo se encuentra en LD con la variante funcional (rs2274756). La importancia de la identificación de “tags SNPs”, lo cual es uno de los objetivos del proyecto internacional del HapMap, es que permite reducir costos en los análisis de genotipificación. Así, este primer estudio del gen *MMP9* en población mexicana, permitirá optimizar recursos en estudios de asociación en donde este gen sea candidato, tomando en cuenta que: 1) de 7 SNPs reportados sólo 4 son polimórficos en la población analizada y 2) de 3 que muestran asociación, uno es un tag SNP. Por lo tanto, sólo los SNPs rs2274756, el cual es no sinónimo y el rs3918247, el cual se encuentra en la región no traducible 5' podrían tener efectos funcionales sobre el gen.

Las diferencias de asociación entre géneros observadas en este análisis para genes como *STAT1* y *TNF $\alpha$* , es un comportamiento que se ha documentado para otros genes y en otras poblaciones. Por ejemplo en un estudio de 644 recién nacidos de la población China, se reportó una asociación entre el SNP +49 A/G del gen *CTLA4* y niveles elevados de IgE en cordón umbilical en nacidos del género femenino (Chang y cols., 2004). Por su parte, Yang y cols. (2004) analizando adultos de la misma población encontraron asociación entre las concentraciones de IgE en suero y el mismo polimorfismo pero solo en mujeres. Otro ejemplo lo da el análisis de asociación entre SNPs y el gen *COX2* (prostaglandina endoperoxidasa y sintasa H 2 de cicloxigenasa 2). En este gen se reportó que el SNP -165 G/C es un modificador de la inflamación bronquial únicamente en mujeres, el homocigoto CC se presentó en mayor frecuencia en población femenina con asma pero no en hombres (OR= 3.08 95% IC, 1.35-6.63, p= 0.01) (Szcseklik y cols., 2004). Por su parte Dijkstra y cols., (2006) también reportan una asociación entre variantes en el receptor de estrógenos y desarrollo de HRB en mujeres. Aunque los mecanismos no están claros, existe la hipótesis de que los estrógenos pueden estar involucrados en el desarrollo anormal del pulmón, o de las VA y esto puede reflejarse en un efecto diferencial entre los géneros (Postma, 2007).

Por otra parte, los datos derivados del análisis de microarreglos de ADN,



sugieren que los genes *ADAMTS19* (5q23.3) y *ETS1* (rs1192402) son nuevos genes candidato en esta entidad. *ADAMT19*, es una metaloproteasa que pertenece a la familia de las proteasas dependientes de zinc con dominios de trombospodina y desintegrina (ADAMTS) y recientemente se ha descrito que desempeña una función relevante en condiciones patológicas como cáncer y artritis (Cal y cols., 2002; Knauff y cols., 2009). Así mismo, un estudio de expresión de metaloproteasas en esputo de pacientes con asma demostraron que la expresión de ADAMs y ADAMTS y sus inhibidores pueden jugar un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (Paulissen y cols., 2006). Por su parte el gen *ETS1* es un factor de transcripción cuya expresión está restringida a los linfocitos y se ha implicado en la regulación de la expresión de genes como *TCR $\alpha$* , *TCR $\beta$* , *CD4*, *IL2* y *TNF $\alpha$*  (McKinlay y cols., 1998). Además, se ha observado que ratones deficientes en *Ets1* presentan altos niveles de transcritos *il17* en los pulmones y un aumento en la producción de moco por las células epiteliales de una forma dependiente de esta citocina (Moisan y cols., 2007). Por lo anterior, ambos representan interesantes genes candidato que deben ser estudiados en un mayor número de pacientes, aunque no se puede descartar la posibilidad de que estas observaciones se deban a un LD con SNPs localizados en otros genes. El cromosoma 5 ha dado evidencia de ligamiento a asma en varios estudios de GWS realizados en diversas poblaciones, particularmente el loci 5q33, una región que contiene al cluster de citocinas Th2 que caracterizan al asma como las IL4, IL13, IL9 (Shek y col., 2001; Noguchi y cols., 2005; Ryu y cols., 2006). Por lo anterior, para determinar si *ADAMTS19* participa en la etiología del asma es necesario realizar un estudio de casos y controles con un mayor número de SNPs de este gen e incrementar el número de pacientes.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que múltiples genes actúan de manera sinérgica en la susceptibilidad del asma y de que existe una gran heterogeneidad genética entre las poblaciones. Además, considerando que existen evidencias que apuntan a que *TNF $\alpha$*  interacciona directa o indirectamente con los mecanismos que regulan la expresión de los genes *CHRM2*, *IL13* y *MMP9*,

por lo que es posible que un mecanismo dependiente de  $TNF\alpha$ , tenga gran relevancia en la etiología del asma. Se requieren de más estudios que permitan conocer estos mecanismos, esclarecer las consecuencias funcionales de los SNPs que mostraron asociación y entender el papel de ellos en la susceptibilidad al asma. Sin duda el presente estudio contribuye al conocimiento del componente genético del asma en población mexicana y sienta las bases para el desarrollo de nuevos proyectos de investigación encaminados a entender mejor la patogénesis de esta entidad, la atopia, la HRB y el de otras patologías inmunes.

## 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 *CHRM2*, *TNF $\alpha$* , *IL13*, *MMP9*, *PDCD1*, *GATA3*, *CHRM3* y *STAT1* confieren riesgo para desarrollar asma en la población infantil mexicana.
4. Los genes *CHRM2*, *PDCD1*, *GATA3*, *CHRM3* y *STAT1* no se han reportado en otras poblaciones como genes de susceptibilidad en asma.
5. El alelo -308A del gen *TNF $\alpha$*  es un factor de riesgo para asma dependiente de género.
6. El SNP rs2274755 del gen *MMP9*, es un “tag” SNP para nuestra población, lo que permitirá reducir costos en el análisis de esta variantes en otras enfermedades.
7. Los datos de microarreglos sugieren a *ADAMTS19* (5q23.3) y *ETS1* (11q24.2) como nuevos genes candidato en asma.
8. Se sugiere la posible participación del gen *SAP30L* en la patogénesis del asma.
9. Es necesario evaluar la relación entre la gravedad del asma y el genotipo para identificar a los genes modificadores de la enfermedad en población infantil mexicana.
10. Este estudio ha contribuido al conocimiento de las bases genéticas del asma en la población mestiza mexicana.

## IX. PERSPECTIVAS

El presente estudio contribuye enormemente a la identificación de factores genéticos de riesgo para padecer asma. Sin embargo el conocimiento generado en él, aún no puede ser utilizado para desarrollar pruebas moleculares que permitan determinar el riesgo para padecer la enfermedad, para modificar los esquemas de tratamiento o para proponer estrategias de prevención basados en el conocimiento genómico. Para alcanzar estos objetivos el siguiente paso en la investigación genómica del asma deberá plantearse las siguientes metas:

1. Identificar el mayor número posible de variantes de riesgo.
2. Evaluar el efecto en la expresión del mensajero de polimorfismos asociados a asma y que se encuentren localizados en regiones 5' y 3' UTR.
3. Determinar si polimorfismos localizados en regiones codificantes que se asocian a asma, modifican la actividad de la proteína.
4. Incrementar el número de casos y controles en el estudio de GWS y densificar el análisis de las regiones que evidencien asociación con asma.
5. Realizar un análisis de casos y controles con polimorfismos localizados en los nuevos genes candidato (derivado del GWS) como *ADAMTS19* y *ETS1*.
6. Realizar un análisis de interacción gen-gen.
7. Establecer la correlación entre el genotipo y el fenotipo.
8. Identificar genes modificadores y aquellos asociados a la respuesta al tratamiento.
9. Evaluar las interacciones gen-ambiente
10. Realizar estudios de replicación en otras poblaciones.

## 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 ADAMTSs, 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, Gomeza 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.

- Guo X, Ni P, Li L. Association between asthma and the polymorphism of HLA-DQ genes. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2001; 24:139-41.
- Hattori H, Rosas LE, Okano M, STAT1 is involved in the pathogenesis of murine allergic rhinitis. *Am J Rhinol* 2007; 21:241-7.
- He JQ, Chan-Yeung M, Becker AB, *et al.* Genetic variants of the IL13 and IL4 genes and atopic diseases in at-risk children. *Genes Immun* 2003; 4:385-9.
- Heaton T, Rowe J, Turner S, *et al.* An immunoepidemiological approach to asthma: identification of in vitro T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children. *Lancet* 2005; 365: 142-149.
- Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, *et al.* Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum Mol Genet* 2000; 9:549-59.
- Hersh CP, Raby BA, Soto-Quirós ME, *et al.* Comprehensive testing of positionally cloned asthma genes in two populations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 176: 849-57.
- Hijazi Z, Haider MZ, Khan MR, Al-Dowaisan AA. High frequency of IgE receptor Fc epsilon RI beta variant (Leu181/Leu183) in Kuwaiti Arabs and its association with asthma. *Clin Genet* 1998; 53:149-52.
- Hinojosa M. El redescubrimiento de la etiología del asma. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 1997; 12:1-31.
- Hoffjan S, Nicolae D, Ober C. Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature. *Respir Res* 2003; 4:14-9
- Holgate ST. Genetic and environmental interaction in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:1139-46.
- Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:872-97.
- Howard TD, Koppelman GH, Xu J, *et al.* Gene-gene interaction in asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma. *Am J Hum Genet* 2002; 70:230-6.
- Huerta J, Penagos M. Asma en Niños. Intersistemas, Méx., 2004. pp. 194.
- Hunt JF, Erwin E, Palmer L, *et al.* Expression and activity of pH-regulatory glutaminase in the human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:101-7.
- Izuhara K, Shirakawa T. Signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy. *Int J Mol Med* 1999; 3:3-10.
- Jiménez-Morales S, Velázquez-Cruz R, Ramírez-Bello J, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha is a common genetic risk factor for asthma, juvenile rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus in a Mexican pediatric population. *Hum Immunol* 2009; 70:251-6.
- Joos L, Sandford A. 2002. Genotype predictors of response to asthma medications. *Curr Opin Pulm Med* 2002; 8:9-15.
- Kabesch M, Schedel M, Carr D, *et al.* IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117:269-74.
- Kanazawa H. Anticholinergic agents in asthma: chronic bronchodilator therapy,



- relief of acute severe asthma, reduction of chronic viral inflammation and prevention of airway remodeling. *Curr Opin Pulm Med* 2006; 12:60-7.
- Karjalainen J, Hulkkonen J, Nieminen MM, et al. Interleukin-10 gene promoter region polymorphism is associated with eosinophil count and circulating immunoglobulin E in adult asthma. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:78-83.
- Keir ME, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 regulates self-reactive CD8+ T cell responses to antigen in lymph nodes and tissues. *J Immunol* 2007; 179:5064-70.
- Kheradmand F, Rishi K, Werb Z. Signaling through the EGF receptor controls lung morphogenesis in part by regulating MT1-MMP-mediated activation of gelatinase A/MMP2. *J Cell Sci* 2002; 115:839-48.
- Kim SH, Bae JS, Holloway JW, et al. A polymorphism of MS4A2 (- 109T > C) encoding the beta-chain of the high-affinity immunoglobulin E receptor (FcepsilonR1beta) is associated with a susceptibility to aspirin-intolerant asthma. *Clin Exp Allergy* 2006; 36:877-83.
- Kim SH, Yang EM, Lee HN, et al. Combined effect of IL-10 and TGF-beta1 promoter polymorphisms as a risk factor for aspirin-intolerant asthma and rhinosinusitis. *Allergy* 2009; 64:1221-5.
- Knauff EA, Franke L, van Es MA, et al. Genome-wide association study in premature ovarian failure patients suggests ADAMTS19 as a possible candidate gene. *Hum Reprod* 2009; 24:2372-8.
- Konstantinidis AK, Barton SJ, Sayers I, et al. Genetic association studies of interleukin-13 receptor alpha1 subunit gene polymorphisms in asthma and atopy. *Eur Respir J* 2007; 30:40-7.
- Lacy K, Archer C, Wood N, Bidwell J. Association between a common IL10 distal promoter haplotype and IgE production in individuals with atopic dermatitis. *Int J Immunogenet* 2009; 36:213-6.
- Laitinen T, Polvi A, Rydman P, et al. Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science* 2004; 304:300-4.
- Lester LA, Rich SS, Blumenthal MN, et al. Ethnic differences in asthma and associated phenotypes: collaborative study on the genetics of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:357-62.
- Liggett S.B. Polymorphisms of the B<sub>2</sub>-adrenergic receptor and asthma. *Am J Resp Crit Care Med* 1997; 156:S156-62.
- Lisker R, Perez Briceño R, Granados J, et al. Gene frequencies and admixture estimates in a Mexico City population. *Am J Phys Anthropol* 1986; 71: 203-7.
- Liu X, Beaty TH, Deindl P, et al. Associations between total serum IgE levels and the 6 potentially functional variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:382-8.
- Lympny P, Welsh K, MacCochrane G, et al. Genetic analysis using ADN polymorphism of the linkage between chromosome 11q13 and atopy and bronchial hyperresponsiveness to methacholine. *J Allergy Clin Immunol*

- 1992; 89:619-28.
- Maeda Y, Hizawa N, Jinushi E, *et al.* Polymorphisms in the muscarinic receptor 1 gene confer susceptibility to asthma in Japanese subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:1119-24.
- Malerba G, Pignatti PF. A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. *J Appl Genet* 2005; 46: 93-104.
- Manian P. Genetics of asthma: A review. *Chest* 1997; 112: 1397-408.
- Martínez FD, Greaves PE, Baldini M, *et al.* Association between genetic polymorphisms of the B2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history wheezing. *J Clin Invest* 1997; 100: 3184-88.
- Martinez-Marignac VL, Valladares A, Cameron E, *et al.* Admixture in Mexico City: implications for admixture mapping of type 2 diabetes genetic risk factors. *Hum Genet* 2007; 120: 807-19.
- Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden. *Allergy* 2004; 59:469-78.
- Mautino G, Oliver N, Chanez P, *et al.* Increased release of matrix metalloproteinase-9 in bronchoalveolar lavage fluid and by alveolar macrophages of asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17:583-91.
- McKinlay LH, Tymms MJ, Thomas RS, *et al.* The role of Ets-1 in mast cell granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression and activation. *J Immunol* 1998; 161:4098-105.
- Meyers DA, Postma DS, Panhuysen CI, *et al.* Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5. *Genomics* 1994; 23:464-70.
- Minshall, EM, Hogg JC, Hamid QA. Cytokine mRNA expression in asthma is not restricted to the large airways. *J Allergy Immunol* 1998; 103:476-83.
- Moffatt MF. Genes in asthma: new genes and new ways. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; 8:411-7.
- Moffatt MF, Schou C, Faux JA, *et al.* Association between quantitative traits underlying asthma and the HLA-DRB1 locus in a family based population sample. *Europ J Hum Genet* 2001; 9:341-6.
- Moisan J, Grenningloh R, Bettelli E, *et al.* Ets-1 is a negative regulator of Th17 differentiation. *J Exp Med* 2007; 204:2825-35.
- Moynihan BJ, Tolloczko B, El Bassam S, *et al.* IFN-gamma, IL-4 and IL-13 modulate responsiveness of human airway smooth muscle cells to IL-13. *Respir Res* 2008; 9:84.
- Mújica-López KI, Flores-Martínez SE, Ramos-Zepeda R, *et al.* Association analysis of polymorphisms in the interleukin-4 receptor (alpha) gene with atopic asthma in patients from western Mexico. *Eur J Immunogenet* 2002; 29:375-8.
- Nakashima K, Hirota T, Obara K, *et al.* A functional polymorphism in MMP-9 is associated with childhood atopic asthma. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344:300-7.
- Nicolae D, Cox NJ, Lester LA, *et al.* Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21. *Am J Hum Genet* 2005; 76:349-57.

- Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, *et al.* Association of asthma and interleukin-4 promoter gene in Japanese. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:449-53.
- Noguchi E, Yokouchi Y, Zhang J, *et al.* Positional identification of an asthma susceptibility gene on human chromosome 5q33. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:183-8.
- Ober C, Cox NJ, Abney M, *et al.* Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population. The Collaborative Study on the Genetics of asthma. *Hum Mol Genet* 1998; 87:1393-8.
- Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun* 2006; 7:95-100.
- Ono S, Tsujimoto H, Hiraki S, *et al.* Sex differences in cytokine production and surface antigen expression of peripheral blood mononuclear cells after surgery. *Am J Surg* 2005; 190:439-44.
- Oshita Y, Koga T, Kamimura T, *et al.* Increased circulating 92 kDa matrix metalloproteinase (MMP-9) activity in exacerbations of asthma. *Thorax* 2003; 58:757-60.
- Ouaked N, Mantel PY, Bassin C, *et al.* Regulation of the foxp3 gene by the Th1 cytokines: the role of IL-27-induced STAT1. *J Immunol* 2009; 182:1041-9.
- Paik Y, Dahl M, Fang D, Calhoun K. Update: the role of FoxP3 in allergic disease. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 16:275-9.
- Park BL, Cheong HS, Kim LH, *et al.* Association analysis of signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) polymorphisms with asthma. *J Hum Genet* 2005; 50:133-8.
- Parks WC, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res* 2001; 2:10-9.
- Paulissen G, Rocks N, Quesada-Calvo F, *et al.* Expression of ADAMs and their inhibitors in sputum from patients with asthma. *Mol Med* 2006; 12:171-9.
- Pearce N, Ait-Khaled N, Beasley R, *et al.* Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* 2007; 62:758-66.
- Pinto LA, Steudemann L, Depner M, *et al.* STAT1 gene variations, IgE regulation and atopy. *Allergy* 2007; 62:1456-61.
- Popper HH, Pailer S, Wurzinger G, *et al.* Expression of adhesion molecules in allergic lung diseases. *Virchows Arch* 2002; 440:172-80.
- Postma DS. Gender differences in asthma development and progression. *Genet Med* 2007; 4 Suppl B:S133-46.
- Proskocil BJ, Fryer AD. Beta2-agonist and anticholinergic drugs in the treatment of lung disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2:305-10.
- Pykäläinen M, Kinos R, Valkonen S, *et al.* Association analysis of common variants of STAT6, GATA3, and STAT4 to asthma and high serum IgE phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:80-7.
- Reihaus E, Innis M, MacIntyre N, Liggett SB. Mutations in the gene encoding for the  $\beta_2$ -adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 334-9.
- Rousell J, Haddad EB, Mak JC, *et al.* BetaAdrenoceptor-mediated down-

- regulation of M2 muscarinic receptors: role of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol Pharmacol* 1996; 49:629–35.
- Ryu HJ, Jung HY, Park JS, *et al.* Gene-based single nucleotide polymorphisms and linkage disequilibrium patterns of 29 asthma candidate genes in the chromosome 5q31-33 region in Koreans. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 139:209-16.
- Santillan AA, Camargo CA Jr, Ramirez-Rivera A, *et al.* Association between beta2-adrenoceptor polymorphisms and asthma diagnosis among Mexican adults. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:1095-100.
- Schedel M, Carr D, Klopp N, *et al.* A signal transducer and activator of transcription 6 haplotype influences the regulation of serum IgE levels. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:1100–05.
- Schork NJ, Fallin D, Lanchbury JS. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet* 2000 ; 58: 250-64.
- Shek LP, Tay AH, Chew FT, *et al.* Genetic susceptibility to asthma and atopy among Chinese in Singapore--linkage to markers on chromosome 5q31-33. *Allergy* 2001; 56:749-53.
- Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease association. *Tissue Antigens* 2004; 64:631-49.
- Shin HD, Park BL, Kim LH, *et al.* Association of tumor necrosis factor polymorphisms with asthma and serum total IgE. *Hum Mol Genet* 2004; 13:397-403.
- Shirakawa T, Li A, Dubowitz M, *et al.* Association between atopy and variants of the  $\beta$ -subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor. *Nature Genet* 1994; 7:125-9.
- Stelmach I, Gorski P, Jerzynska J, *et al.* A randomized, double-blind trial of the effect of treatment with formoterol on clinical and inflammatory parameters of asthma in children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89:67-73.
- Suttner K, Depner M, Klopp N, *et al.* Genetic variants in the GATA3 gene are not associated with asthma and atopic diseases in German children. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:1179-81.
- Szczeklik W, Sanak M, Szczeklik A. Functional effects and gender association of COX-2 gene polymorphism G-765C in bronchial asthma. *Allergy Clin Immunol* 2004; 114:248-53.
- Szczepankiewicz A, Breborowicz A, Sobkowiak P, *et al.* Pneumonal ipratropium bromide in asthmatic children. *Alergol Pol* 2009; 77:5-10.
- Teerlink CC, Camp NJ, Bansal A, *et al.* Significant evidence for linkage to chromosome 5q13 in a genome-wide scan for asthma in an extended pedigree resource. *Eur J Hum Genet* 2009; 17:636-43.
- Traherne JA, Hill MR, Hysi P, *et al.* LD mapping of maternally and non-maternally derived alleles and atopy in FcepsilonRI-beta. *Hum Mol Genet* 2003; 12:2577-85.
- Turki J, Pak J, Green S, *et al.* Genetic polymorphisms of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor

- in nocturnal and nonnocturnal asthma. *J Clin Invest* 1995; 95:1635-41.
- Umetsu DT. Revising the immunological theories of asthma and allergy. *Lancet* 2005; 365:98–100.
- Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, *et al.* Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 2002; 418:426- 30.
- Velázquez-Cruz R, Orozco L, Espinosa-Rosales F, *et al.* Association of PDCD1 polymorphisms with childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet* 2007; 15:336-41.
- Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:169-82.
- Viiri KM, Jänis J, Siggers T, *et al.* ADN-binding and -bending activities of SAP30L and SAP30 are mediated by a zinc-dependent module and monophosphoinositides. *Mol Cell Biol* 2009; 29:342-56.
- Viiri KM, Korkeamäki H, Kukkonen MK, *et al.* SAP30L interacts with members of the Sin3A corepressor complex and targets Sin3A to the nucleolus. *Nucleic Acids Res* 2006; 34:3288-95.
- Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodríguez-Cruz M, *et al.* The ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant affects HDL cholesterol levels and BMI in the Mexican population: association with obesity and obesity-related comorbidities. *Diabetes* 2007; 56:1881-7.
- Vladich FD, Brazille SM, Stern D, *et al.* IL-13 R130Q, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector mechanisms essential for human allergic inflammation *J Clin Invest* 2005; 115: 747–54.
- Walley AJ, Cookson WO. Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy. *J Med Genet* 1996; 33:689-92.
- Wang JC, Hinrichs AL, Stock H, *et al.* Evidence of common and specific genetic effects: association of the muscarinic acetylcholine receptor M2 (CHRM2) gene with alcohol dependence and major depressive syndrome. *Hum Mol Genet* 2004; 13:1903-11.
- Wang XD, Zhang L, Duan H, *et al.* [Association of single nucleotide polymorphisms of GATA3 with allergic rhinitis phenotypes in Chinese]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2008; 43:494-8.
- Weidinger S, Gieger C, Rodriguez E, *et al.* Genome-wide scan on total serum IgE levels identifies FCER1A as novel susceptibility locus. *PLoS Genet* 2008; 4:e1000166.
- Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, *et al.* Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998; 282:2258–61.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, *et al.* Effects of a polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:3195–9.
- Witte JS, Palmer LJ, O'Connor RD, *et al.* Relation between tumor necrosis factor polymorphism TNF-alpha-308 and risk for asthma. *Europ J Hum Genet* 2002; 10:82-85.
- Wjst M, Fischer G, Immervoll T, *et al.* 1999. A genome-wide search for linkage to asthma. *German Asthma Genetics. Genomics* 1999; 58:1-8.

- Wood N, Whitters MJ, Jacobson BA, *et al.* Enhanced interleukin (IL)-13 responses in mice lacking IL-13 receptor  $\alpha 2$ . *J Exp Med* 2003; 197:703-9.
- Wu H, Romieu I, Sienra-Monge JJ, *et al.* Parental smoking modifies the relation between genetic variation in tumor necrosis factor-alpha (TNF) and childhood asthma. *Environ Health Perspect* 2007; 115:616-22.
- Wu H, Romieu I, Sienra-Monge JJ, *et al.* Lack of association between genetic variation in G-protein-coupled receptor for asthma susceptibility and childhood asthma and atopy. *Genes Immun* 2008; 93:224-30.
- Xiong M, Jin L. Comparison of the power and accuracy of biallelic and microsatellite markers in population-based gene-mapping methods. *Am J Hum Genet* 1999; 64:629-40.
- Yamamoto T, Yamashita N, Kuwabara M, *et al.* Mutation screening of the muscarinic m2 and m3 receptor genes in asthmatics, outgrow subjects, and normal controls. *Ann Genet* 2002; 45:109-13.
- Yamashita N, Tashimo H, Ishida H, *et al.* Involvement of GATA3 dependent Th2 lymphocyte activation in airway hyperresponsiveness. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290:L1045–51.
- Yancey SW, Klotsman M, Ortega HG, *et al.* Acute and chronic lung function responses to salmeterol and salmeterol plus fluticasone propionate in relation to Arg16Gly beta(2)-adrenergic polymorphisms. *Curr Med Res Opin.* 2009; 25:1011-8
- Yang KD, Liu CA, Chang JC, *et al.* Polymorphism of the immune-braking gene CTLA-4 (+49) involved in gender discrepancy of serum total IgE levels and allergic diseases. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:32-7.
- Zamel N, McClean PA, Sandell PR, *et al.* Asthma on Tristan da Cunha: looking for the genetic link. The University of Toronto Genetics of Asthma Research Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:1902–6.
- Zhang J, Paré PD, Sandford AJ. Recent advances in asthma genetics. *Respir Res* 2008; 9:1-8.
- Zhang Y, Leaves NI, Anderson GG, *et al.* Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma. *Nat Genet* 2003; 34:181-6.
- Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, *et al.* GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res* 2006; 16:3–10.

## **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, consanguineidad, 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.

México, D. F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_\_\_

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

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

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

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

Atentamente

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

\_\_\_\_\_  
Asentimiento del menor

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo

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

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del Investigador (No. Telefónico)



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

1.- Folio

**FICHA DE IDENTIFICACIÓN**

Fecha \_\_\_\_\_

Institución \_\_\_\_\_

1. Nombre \_\_\_\_\_

2. Tipo de asma \_\_\_\_\_

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

3.- Caso índice (0) Familiar (1)

4.- Registro \_\_\_\_\_

5. Sexo 0=masc, 1=Fem

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

7. Fecha de nacimiento \_\_\_\_\_

8. Dirección actual \_\_\_\_\_

9. Tel. \_\_\_\_\_

10.- Lugar de nacimiento del paciente \_\_\_\_\_

11.- Origen del padre \_\_\_\_\_

Origen étnico: 12.- Padre \_\_\_\_\_ 13.- Madre \_\_\_\_\_

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

18.- Historia familiar \_\_\_\_\_

19.- Otros (especifique) \_\_\_\_\_

20.- Edad de inicio de los síntomas \_\_\_\_\_   
años, meses en decimales

21.- Edad al diagnóstico \_\_\_\_\_   
años, meses en decimales

**ANTECEDENTES PERSONALES**

- 22. Enfermedad atópica \_\_\_\_\_
- 23. Dermatitis \_\_\_\_\_
- 24. Rinitis \_\_\_\_\_
- 25. Asma \_\_\_\_\_
- 26. Alergía a medicamentos \_\_\_\_\_
- 27. Alergía a alimentos \_\_\_\_\_
- 28. Otros \_\_\_\_\_

**ESTADO ACTUAL**

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

35. Otros \_\_\_\_\_

36.- Talla  cm      37.- Percentila CDC

38.- Peso  kg      39.- Percentila CDC

## EXAMENES DE LABORATORIO Y GABINETE

Indicar el valor obtenido:

40. Niveles de IgE (técnica) \_\_\_\_\_

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

Alérgenos tipos \_\_\_\_\_

## FUNCION PULMONAR

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

## EVOLUCIÓN EN EL ULTIMO AÑO

51.- Tratamiento y seguimiento \_\_\_\_\_

52.- Desde hace \_\_\_\_\_    meses

53.- No. de crisis agudas \_\_\_\_\_

<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>

54.- N° de hospitalizaciones \_\_\_\_\_

<input type="text"/>	<input type="text"/>
----------------------	----------------------

55.- Manejo servicio de urgencias \_\_\_\_\_

<input type="text"/>	<input type="text"/>
----------------------	----------------------

56.- Crisis en casa \_\_\_\_\_

<input type="text"/>	<input type="text"/>
----------------------	----------------------

57.- N° de visitas de seguimiento \_\_\_\_\_

0= no, 1= continuo, 2= intermitente

58. Tratamiento en casa \_\_\_\_\_

**TRATAMIENTO EN LOS ÚLTIMOS TRES MESES**

59.- Tratamiento   
 0 = regular      1= irregular

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

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

**COMPLICACIONES EN EL ÚLTIMO AÑO**

61.- Respiratorias \_\_\_\_\_   
 0= no, 1= sí, 9= se ignora

62.- Fallecimiento \_\_\_\_\_

63.- Edad al fallecimiento \_\_\_\_\_   
 años meses en decimales

64.- Causa de muerte \_\_\_\_\_

**HISTORIA FAMILIAR DE ASMA O ALERGIA**

64.- Consanguinidad de los padres \_\_\_\_\_   
 66.- N° de hermanos afectados \_\_\_\_\_   
 67.- N° de hermanos sanos \_\_\_\_\_   
 68.- N° tíos paternos sanos \_\_\_\_\_   
 69.- N° de tíos paternos afectados \_\_\_\_\_

70.- N° de tíos maternos sanos \_\_\_\_\_

71.- N° de tíos maternos afectados \_\_\_\_\_

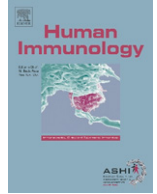
72.- N° de primos hermanos afectados (maternos) \_\_\_\_\_

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

74- Otros familiares afectados \_\_\_\_\_

Especifique \_\_\_\_\_

### **ARBOL GENEALÓGICO**



## Tumor necrosis factor- $\alpha$ is a common genetic risk factor for asthma, juvenile rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus in a Mexican pediatric population

Silvia Jiménez-Morales <sup>a,b</sup>, Rafael Velázquez-Cruz <sup>a</sup>, Julián Ramírez-Bello <sup>a</sup>,  
Edmundo Bonilla-González <sup>b</sup>, Sandra Romero-Hidalgo <sup>c</sup>, Guillermo Escamilla-Guerrero <sup>d</sup>,  
Francisco Cuevas <sup>e</sup>, Francisco Espinosa-Rosales <sup>f</sup>, Nora Ernestina Martínez-Aguilar <sup>g</sup>,  
Javier Gómez-Vera <sup>h</sup>, Vicente Baca <sup>i</sup>, Lorena Orozco <sup>a,c,j,\*</sup>

<sup>a</sup> Genomic of Complex Diseases Laboratory, Instituto Nacional de Medicina Genómica, SS, Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> PhD Program in Experimental Biology, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico

<sup>c</sup> National Coordination of Genomic Medicine, Instituto de Seguridad Social y Servicios para los Trabajadores del Estado, Mexico City, Mexico

<sup>d</sup> Blood Bank, Instituto Nacional de Pediatría SS, Mexico City, Mexico

<sup>e</sup> Department of Pneumology and Thorax Surgery, Instituto Nacional de Pediatría SS, Mexico City, Mexico

<sup>f</sup> Department of Immunology, Instituto Nacional de Pediatría SS, Mexico City, Mexico

<sup>g</sup> Allergy Services, Hospitales Regionales 1° de Octubre, Instituto de Seguridad Social y Servicios para los Trabajadores del Estado, Mexico City, Mexico

<sup>h</sup> Allergy Service, Hospitales Adolfo López Mateos, Instituto de Seguridad Social y Servicios para los Trabajadores del Estado, Mexico City, Mexico

<sup>i</sup> Department of Rheumatology, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico

<sup>j</sup> Genomics Sciences Program, Universidad Autónoma de la Cd. de México, Mexico City, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 August 2008

Accepted 28 January 2009

Available online 4 February 2009

#### Keywords:

Tumor necrosis factor alpha

Association studies

Asthma

Systemic lupus erythematosus

Juvenile rheumatoid arthritis

Childhood Mexican patients

### ABSTRACT

There is a great deal of evidence that points to the association of the tumor necrosis factor- $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ) gene as a common genetic factor in the pathogenesis of diseases that are caused by inflammatory and/or autoimmune etiologies. Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) identified in the *TNF- $\alpha$*  promoter region have been associated with disease susceptibility and severity. We investigated whether -308G/A and -238G/A *TNF- $\alpha$*  polymorphisms were associated with asthma, systemic lupus erythematosus (SLE), and juvenile rheumatoid arthritis (JRA) in a pediatric Mexican population. In a case-control study of 725 patients (asthma: 226, JRA: 171, and SLE: 328) and 400 control subjects, the participants were analyzed using the allelic discrimination technique. The genotype distribution of both *TNF- $\alpha$*  polymorphisms was in Hardy-Weinberg equilibrium in each group. However, there were significant differences in the allele frequency of *TNF- $\alpha$* -308A between the patients and the healthy controls. This allele was detected in 2.9% of the controls, 6.0% of asthmatic and JRA patients ( $p = 0.002$  and  $p = 0.0086$ ), and 6.7% of SLE patients ( $p = 0.00049$ ); statistical significance was maintained after ancestry stratification (asthma:  $p = 0.0143$ , JRA:  $p = 0.0083$ , and SLE:  $p = 0.0026$ ). Stratification by gender showed that the risk for the -308A allele in asthma and JRA was greater in females (OR = 4.16,  $p = 0.0008$  and OR = 4.4,  $p = 0.0002$ , respectively). The *TNF- $\alpha$* -238A allele showed an association only with JRA in males (OR = 2.89,  $p = 0.004$ ). These results support the concept that the *TNF- $\alpha$*  gene is a genetic risk factor for asthma, SLE, and JRA in the pediatric Mexican population.

© 2009 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

There is strong evidence supporting the role of cytokine and cytokine receptor genes in the pathogenesis of inflammatory and/or autoimmune diseases [1–3]. The differences in the production of these cytokines, as well as the participation of other genetic

factors, likely account for the marked clinical heterogeneity among such diseases. One of the major cytokines that has been intensely investigated is the tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a multifunctional cytokine T helper 1 (Th1) molecule [4,5]. TNF- $\alpha$  plays a central role in inflammation; it induces the expression of other proinflammatory molecules, chemotactic cytokines and adhesion factors [5,6]. *In vivo* and *in vitro* studies have shown that high levels of TNF- $\alpha$  lead to exacerbation of the inflammatory response. This, together with its potent immunomodulator activities, has been suggested as important to the pathogenesis of diseases such as asthma, systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid ar-

This work was submitted in partial fulfilment of the requirements for the PhD degree for SJM at Doctorado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana.

\* Corresponding author.

E-mail address: [lorozco@inmegen.gob.mx](mailto:lorozco@inmegen.gob.mx) (L. Orozco).



thritis (RA) [7–9]. Several studies have shown that high serum TNF- $\alpha$  levels are linked to several pathologic features such as hyperresponsiveness in asthma, joint destruction in RA and the production of autoantibodies in SLE [10–16]. Furthermore, TNF- $\alpha$  exerts a wide variety of immunoregulatory effects on several cell types such as B and T lymphocytes, dendritic cells, and mast cells, which are relevant to the pathogenesis of these diseases [6,9,11,14].

The TNF- $\alpha$  gene is a member of the TNF superfamily located within the class III region of the human major histocompatibility complex (MHC) on chromosome 6p21 [17]. Several SNPs have been identified in the TNF- $\alpha$  gene [18–20]. However, the most extensively studied are the biallelic TNF- $\alpha$  308 G/A and TNF- $\alpha$  238 G/A polymorphisms in the promoter region [21–40]. There is no strong evidence to date showing that the –308 site is a binding site for transcription factors, or is correlated with protein expression [41,42]. However, the TNF- $\alpha$ -308A allele appears to be associated with a several fold increase in transcriptional activity and has been associated with increased levels of TNF [13,43,44]. In fact, recent studies have shown that individuals carrying the GA genotype have a greater amount of TNF- $\alpha$  mRNA, and serum level concentrations, than individuals with the GG genotype; the AA genotype was not present in their sample [10,45,46]. Similarly, Louis et al. [47], reported an *in vitro* study where cells stimulated with lipopolysaccharide, from individuals with the TNF- $\alpha$ -308A allele, expressed more TNF- $\alpha$  than did the cells from individuals that were homozygous for the G allele. On the other hand, although the effect of other polymorphisms on gene regulation has not been clearly defined, current data suggest that the TNF- $\alpha$ -238 polymorphism appears to influence gene function; for example, the TNF- $\alpha$ -238G allele has been shown to create a CpG methylation site that could modulate the gene transcriptional rate [48].

Many independent studies, and several meta-analyses, have shown that these polymorphisms are associated with the susceptibility and severity of asthma, SLE and RA, particularly the TNF- $\alpha$ -308A allele [49–51]. However, these observations have not been replicated in all populations, suggesting the possibility of ethnic differences [21,22,27,30,33,52–55].

Given the known importance of TNF- $\alpha$  in inflammatory and/or immune functions and the variation in susceptibility to immune disorders in different ethnic groups, we investigated the association of this gene with the development of asthma, juvenile rheumatoid arthritis (JRA) and SLE in a pediatric Mexican population.

## 2. Subjects and methods

### 2.1. Study population

A total of 226 patients with asthma, 171 with JRA and 328 with SLE, were enrolled into this study. All patients were less than 16 years of age and were recruited from four tertiary level institutions located in Mexico City. The diagnosis of asthma was made based on the definition used by the American Thoracic Society and the Global Initiative for Asthma (GINA) criteria. The patients with JRA and SLE fulfilled the American College of Rheumatology (ACR) criteria for the diagnosis. Because there is no evidence of a correlation between TNF alleles and age [56], we included 400 unrelated healthy subjects more than 18 years of age, without autoimmune or inflammatory disease as healthy controls. The study was conducted with the approval of the ethics and research committees from all four participating institutions. Informed parental consent was obtained for all patients. Parents provided consent for the children's participation and the children assented.

### 2.2. Genotyping analysis

Genomic DNA was extracted from blood samples using the standard salting out technique (QIAgen Systems, Inc., Valencia, CA,

USA). Genotyping analyses of TNF- $\alpha$ -308 G/A and TNF- $\alpha$ -238 G/A polymorphisms were performed using the TaqMan allelic discrimination assay (Applied Biosystems, Foster City, CA). The polymerase chain reaction (PCR) was carried out using the ABI PRISM 7900 system. The primers were added in a PCR mix consisting of 10 ng of genomic DNA, 2.5  $\mu$ l of TaqMan master mix, 0.125  $\mu$ l of 20X assay mix, and ddH<sub>2</sub>O up to a final volume of 5  $\mu$ l. The amplification protocol included denaturing at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of denaturing at 95°C for 15 seconds and annealing and extension at 60°C for 1 minute. The genotype of each sample was assigned automatically by measuring the allele-specific fluorescence using SDS 2.2.3 software for allelic discrimination (Applied Biosystems, Foster City, CA).

The overall genotype call rate by TaqMan was 99.9%; only one sample for asthma and SLE diseases were not successful in one of the SNPs analyzed. A total of 426 randomized samples were genotyped in duplicate for both polymorphisms; the genotyping reproducibility was 100%. To confirm the TNF- $\alpha$ -308 genotype, 100 random samples, and the only AA homozygote case, were sequenced.

The PCR products were sequenced directly with a DNA Sequencing Kit with the Big Dye Terminator on an automated ABI PRISM 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems). The forward and reverse primer sequences were 5'-AAACAGACCACAGACCTGGTC-3' and 5'-GGGAGGATGGGAGTGTGAG-3' [29]. We also evaluated a panel of 10 informative ancestry markers (rs4884, rs2695, rs17203, rs2862, rs3340, rs722098, rs203096, rs223830, rs1800498, and rs281478) that mainly distinguish Amerindian and European ancestry ( $\delta > 0.44$ ). These markers have been validated in prior case-control studies in the Mexican population [57,58].

### 2.3. Statistical analysis

The FINNETI program (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) was used to test Hardy-Weinberg equilibrium for genotype distributions in the cases and controls. Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (95% CIs) were calculated using allele frequencies for the case patients and controls. The Stat-Calc program (Epic Info 2005 V.3.2; Centers of Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) was used for all statistical calculations. The  $\chi^2$  value was calculated from  $2 \times 2$  contingency tables, and values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. The ADMIXMAP program [59] was used to test the possible effect of population stratification, as previously described in prior studies [60,61] and performed with the two primary parental populations of Mexican-Mestizo (Amerindian and European). Because of the almost complete absence of AA homozygotes in both SNPs, we used a dominant model of inheritance. We included a gender covariate as a potential confounder and the genotype was considered a fixed factor, using the logistic regression fits in the ADMIXMAP. However, age was not considered a confounding factor, since there is no evidence that the TNF- $\alpha$  polymorphisms may be related to a lesser life span.

The statistical power for asthma, JRA, and SLE studies was estimated using QUANTO software (version 1.2; <http://hydra.usc.edu/GxE/>) and all of them reached more than 80% under dominant model.

## 3. Results

The asthmatic patients ranged in age from 5 to 17 years and fulfilled the GINA criteria for asthma. The SLE and JRA cohorts included patients from less than 16 years of age at onset of disease and fulfilled the ACR criteria. The mean ( $\pm$ SD) age at onset of asthma, JRA, and SLE were  $8.4 \pm 2.8$ ,  $8.7 \pm 2.46$ , and  $11.62 \pm 2.46$  years, respectively. The female/male gender distribution was 83 (37%)/143 (63%) among asthmatic patients, 97 (57%)/74 (43%) in the JRA patients, and 274 (84%)/54 (13%) in the SLE patients. The gender ratio for the 400 healthy, ethnically matched controls was 1:1 (female:male); all were more than 18 years of age. Because

**Table 1**  
Allelic distribution and OR analysis of –308 G/A and –238 G/A *TNF-α* polymorphisms in asthma, JRA and SLE

TNF polymorphism	Allele G/A	$\chi^2$ Test		Adjusting by ancestry	
		OR (95% CI)	<i>p</i> <sup>a</sup>	OR (95% CI)	<i>p</i> <sup>b</sup>
<b>–308</b>					
Control <i>n</i> (%)	777 (97.1) / 23 (2.9)				
Asthma <i>n</i> (%)	423 (94.0) / 29(6.0)	2.32 (1.28–4.20)	0.002*	2.38 (1.65–3.38)	0.0143
JRA <i>n</i> (%)	321 (94.0) / 21 (6.0)	2.21 (1.16–4.21)	0.0086*	2.30 (1.57–3.28)	0.0083
SLE <i>n</i> (%)	610 (93.3) / 44 (6.7)	2.44 (1.42–4.21)	0.00049*	2.77 (1.96–3.93)	0.0026
<b>–238</b>					
Control <i>n</i> (%)	767 (95.9) / 33 (4.1)				
Asthma <i>n</i> (%)	429 (95.0) / 21 (5.0)	1.14 (0.63–2.06)	0.69	1.42 (0.96–2.10)	0.40
JRA <i>n</i> (%)	321 (93.9) / 16 (6.1)	1.52 (0.87–2.70)	0.14	2.01 (1.39–2.85)	0.11
SLE <i>n</i> (%)	624 (95.1) / 32 (4.9)	1.19 (0.70–2.02)	0.48	1.21 (0.84–1.70)	0.47

<sup>a</sup>After Bonferroni correction: asthma: *p* = 0.004; JRA: *p* = 0.017; SLE: *p* = 0.00098.

<sup>b</sup>Values after using dominant model.

differences between the genders in healthy individuals were not observed, when allelic frequencies of *TNF-α*-308 G/A and *TNF-α*-238 G/A polymorphisms were compared (*p* = 0.20 and 0.6, respectively), we used the same control group for all analyses. Genotype distributions of *TNF-α*-308 G/A and *TNF-α*-238 G/A polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium in the cases (asthma: *p* = 0.55 and 0.30; JRA: *p* = 0.68 and 0.44; SLE: *p* = 0.8 and 0.66) and the controls (*p* = 0.46 and 0.54). The allele frequencies of both *TNF-α* polymorphisms, in patients and healthy controls, are shown in Table 1.

The *TNF-α*-308A allele was more frequent in asthma, JRA, and SLE case patients than in the controls. This allele was carried by only 2.9% of the controls, whereas among the three groups of patients it was similar; in the asthma and JRA patients it was observed in 6.0% of cases (OR = 2.32, 95% CI 1.28–4.2, *p* = 0.002; OR = 2.21, 95% CI 1.16–4.21, *p* = 0.0086, respectively), and for the patients with SLE it was present in 6.7% of cases (OR = 2.44, 95% CI = 1.42–4.21, *p* = 0.00049). The *TNF-α*-308A association remained significant after Bonferroni correction (asthma: *p* = 0.004; JRA: *p* = 0.017; and SLE: *p* = 0.00098). Adjusting for ancestry, the following values were noted: for asthma, OR = 2.38, 95% CI = 1.65–3.38, *p* = 0.0143; for JRA, OR = 2.3, 95% CI = 1.57–3.28, *p* = 0.0083; and for SLE, OR = 2.77, 95% CI = 1.96–3.93, *p* = 0.0026 (Table 1).

When we compared the frequency of the *TNF-α*-308 genotypes containing the A allele (GA + AA) between the case patients and controls, a significant difference was observed for all three diseases: asthma (OR = 2.41, 95% CI = 1.31–4.45, *p* = 0.002), JRA (OR = 2.29, 95% CI = 1.18–4.46, *p* = 0.007), and SLE (OR = 2.48, 95% CI = 1.42–4.36, *p* = 0.0005). Only one homozygote AA was identified in a patient with SLE. Sequencing 100 random and the AA homozygote samples confirmed the *TNF-α*-308 genotype.

Stratification analysis by gender showed a specific female gender association between the *TNF-α*-308A allele and both asthma (OR = 4.16, 95% CI = 1.58–11.23, *p* = 0.0008) and JRA (OR = 4.4, 95% CI = 1.74–11.46, *p* = 0.0002). However, both female and male SLE patients showed significant differences from the controls (*p* = 0.001 vs 0.04 respectively; Table 2).

The *TNF-α*-238G/A failed to show an association with asthma (*p* = 0.69), JRA (*p* = 0.14), or SLE (*p* = 0.48). However, a significant difference was observed when we compared the frequency of the A allele between the male JRA patients and the male controls (10.1% vs 3.7% respectively, OR = 2.89, 95% CI = 1.37–6.08, *p* = 0.004), this association remained after correction for ancestry (*p* = 0.017; data not shown). The frequency of the *TNF-α*-308A allele, obtained in our healthy Mexican sample (2.9%) was significantly different from that of other populations described elsewhere (Table 3).

#### 4. Discussion

*TNF-α* is a proinflammatory cytokine involved in several biological processes shared by many immune diseases such as tissue

remodeling, epithelial cell barrier permeability, macrophage activation, recruitment of inflammatory infiltrates, effectiveness of the local and systemic inflammatory response, and amplification of the effects of other proinflammatory cytokines [3–5]. The important role of this cytokine in the initiation and perpetuation of immune diseases has been supported by the clinical findings of improved symptoms in patients with RA, asthma, and SLE after treatment with recombinant anti-*TNF-α* antibodies [62–65]. Multiple association studies evaluating the association between *TNF-α* polymorphisms and these immune diseases also support this relationship [21–40,66]. One of the SNPs that has consistently shown an association with susceptibility to these three diseases is *TNF-α*-308 G/A; in fact, the A allele of this polymorphism has been correlated with an increase in transcription activity and secretion levels of this cytokine [43–47]. We found a similar frequency of the *TNF-α*-308A allele (2.9%) as reported by previous studies in healthy Mexican individuals (3–4%) [21,22], showing that there is no difference in the frequency of this allele between children and adults. In this study, the age of the case patients (<17 years) and healthy controls (<18 years) was significantly different; however, given that there is no evidence that *TNF-α* polymorphisms may be related to an less life span that could increase the *TNF-α*-308A allele in childhood group, age was not considered as a confounding factor in this study. Moreover, in a study testing the relationship between the *TNF-α*-308 SNP, as a predisposing factor to longevity in Mexican Mestizo healthy elders, the *TNF-α*-308A allele frequency increased in the elder group when compared with young controls [56]. This would suggest that we might expect to find a higher frequency of this allele in controls compared with case patients, contrary to what we actually observed.

The results of this study confirm the association between the *TNF-α*-308A allele and asthma, as has been found in most populations, including Mexican patients [63]. To date, only in Italian, Belgian, Japanese, and Korean populations does this allele appear to be either protective or has it not been found to be associated with asthma [30,31,36]. Of note, among our asthmatic patients we found

**Table 2**  
OR of the *TNF-α* –308A allele in female and male patients

Gender	Disease	Samples, <i>n</i>	Alleles <i>n</i> G/A	OR (95% CI)	<i>p</i> Value
Female	Controls	200	392 / 8		
	Asthma	83	153 / 13	<b>4.16 (1.58–11.23)</b>	<b>0.0008</b>
	JRA	97	178 / 16	<b>4.40 (1.74–11.46)</b>	<b>0.0002</b>
	SLE	273 <sup>a</sup>	511 / 35	<b>3.36 (1.47–7.93)</b>	<b>0.001</b>
Male	Asthma	143	285 / 17	1.53 (0.71–3.29)	0.23
	JRA	74	143 / 5	0.90 (0.28–2.7)	0.83
	SLE	54	99 / 9	<b>2.33 (0.91–5.85)</b>	<b>0.04</b>

Bold characters mean significant values.

<sup>a</sup>One case was not successful in the genotyping analysis.

**Table 3**Genotypes and alleles frequencies of *TNF- $\alpha$* -308G/A polymorphism in healthy populations from different geographic regions

Geographic region	Samples n	GG	Genotype n (%)		p	Alleles n	Alleles n (%)		p
			GA	AA			G	A	
North America									
Current study	400	377 (94)	23 (6)	0 (0)	—	800	777 (97)	23 (3)	—
Mexico (21)	55	52 (94)	3 (6)	0 (0)	0.93	110	107 (97)	3 (3)	0.93
Mexico (22)	166	148 (91)	14 (9)	0 (0)	0.33	232	310 (96)	14 (4)	0.33
USA (23)	273	212 (78)	55 (20)	6 (2)	*	546	479 (88)	67 (12)	*
Canada (24)	108	81 (75)	25 (23)	2 (2)	*	216	187 (87)	29 (13)	*
South America									
Chile (25)	42	38 (90)	4 (10)	0 (0)	0.33	82	80 (98)	4 (2)	0.33
Colombian (26)	430	338 (79)	87 (20)	5 (1)	*	860	763 (89)	97 (11)	*
Europe									
Italy (27)	45	36 (80)	8 (18)	1 (2)	*	90	80 (89)	10 (11)	*
Spain (28)	343	265 (77)	71 (21)	7 (2)	*	686	601 (88)	85 (12)	*
UK (29)	691	522 (75)	149 (22)	20 (3)	*	1382	1193 (86)	189 (14)	*
Belgium (30)	95	64 (67)	31 (33)	0 (0)	*	190	159 (84)	31 (16)	*
Sweden (31)	103	70 (68)	27 (26)	6 (6)	*	206	167 (81)	39 (19)	*
Czech (32)	155	116 (75)	38 (24)	1 (1)	*	310	270 (87)	40 (13)	*
Asia									
Japan (33)	465	454 (98)	10 (2)	1 (0)	*	930	918 (99)	12 (1)	*
Iran (34)	113	103 (91)	9 (8)	1 (1)	0.11	126	215 (95)	11 (5)	0.14
Taiwan (35)	99	89 (90)	10 (10)	0 (0)	0.18	198	188 (95)	10 (5)	0.12
Korea (36)	170	131 (77)	37 (22)	2 (1)	*	340	299 (88)	41 (12)	*
South Korea (37)	300	231 (77)	65 (22)	4 (1)	*	600	527 (88)	73 (12)	*
Hong Kong (37)	100	79 (79)	19 (19)	2 (2)	*	200	177 (88)	23 (12)	*
China (38)	149	111 (86)	18 (14)	0 (0)	*	258	240 (93)	18 (7)	*
India (10)	252	217 (86)	33 (13)	2 (1)	*	504	467 (93)	37 (7)	*
Africa									
Gambia (39)	325	224 (69)	97 (30)	4 (1)	*	650	545 (84)	105 (16)	*
Oceania									
Australia (40)	312	211 (68)	89 (28)	12 (4)	*	624	511 (82)	113 (18)	*

\**p* < 0.05 statistically significant.

one of the highest odds ratios (ORs; 2.41) worldwide for heterozygous *TNF- $\alpha$* -308. However, as we did not detect homozygous *TNF- $\alpha$* -308A in this group of patients, we could not determine whether the risk for asthma was increased in Mexicans in the homozygous state, as described in other studies [34,49].

Prior studies have reported that Mexicans with the *TNF- $\alpha$* -238A allele are at risk for SLE and RA in adulthood [21,22]. Regarding SLE and the *TNF- $\alpha$* -308A allele, our data are similar to those published previously, mainly in European-derived populations, but surprisingly they are in contrast to prior reports on adult Mexican SLE patients [21,50]. The discrepancies between our findings in the SLE pediatric patients and the previously reported findings in adult Mexican patients [21] could be caused by differences in the sample sizes studied or other differences in study design, laboratory methods, and analysis; for our study the Zuñiga *et al.* analysis had a low statistical power because of the small sample size (*n* = 52). Although prior studies that included the *IRF5* and *PDCD1* genes reported similar frequencies among Mexican adults and children in SLE cohorts [67,68], we cannot rule out the possibility that the SNPs associated with late-onset disease might be different in childhood or that there may be a greater background of susceptibility alleles in earlier-onset disease.

Meta-analyses have demonstrated that the *TNF- $\alpha$* -308A allele may represent a significant risk factor for RA, particularly in Latin Americans [51,69]. Given that RA shares an autoimmune background as well as other pathogenetic features with JRA, we included JRA in this study. We found an association of this allele with susceptibility to JRA. However, this has not been observed in Turkish, Czech, German, and Spanish populations [32,69,70], suggesting that, similar to RA, the *TNF- $\alpha$* -308A allele is associated with JRA mainly in Latin Americans.

Distribution by gender of the *TNF- $\alpha$* -308A allele revealed that in the patients with SLE it was associated with risk for the disease in both males and females; however, this allele was not associated

with susceptibility in males with asthma or JRA. Regarding the *TNF- $\alpha$* -238G/A polymorphism, we did not find an association with asthma or SLE; however, there was an association with susceptibility to JRA with the *TNF- $\alpha$* -238A allele in males (data not shown). The association of gender differences with the distribution of alleles has been documented in asthma and RA. In fact, specific alleles of *COX-2* (prostaglandin endoperoxide H synthase cyclooxygenase gene) have been associated with susceptibility, particularly in female asthmatic patients [71–73]. In addition, in other inflammatory diseases, HLA alleles and IL4 SNPs have been found to be associated with susceptibility in males with bowel disease, and in females with multiple sclerosis, respectively [74,75]. These results, in combination with the fact that some diseases have a different gender prevalence, suggest that certain genetic factors may influence disease risk in a gender-dependent manner. We discarded gender as a confounding covariate, as there were no significant differences in the frequencies of the polymorphisms between males and females. These data were confirmed by logistic regression analysis with the ADMIXMAP software (<http://homepages.ed.ac.uk/pmckeigu/admixmap/index.html>).

The findings of this study show the necessity for further analysis to understand the complex mechanisms involved in immune diseases and to illustrate the importance of stratifying data by gender in all studies that include genetic factors. Although there is evidence of no linkage disequilibrium (LD) between *TNF* and HLA alleles in the Mexican population [22,76–78], we cannot rule out the possibility that our results were influenced by LD between these genes; LD between *DRB1* and *TNF* alleles in European and European derived-populations have been reported [79,80], and European ancestry is a significant component of Mexican ancestry. In fact, Granados *et al.* reported that the HLA-*DRB1*\*0301 is common among adult Mexican patients with SLE [81].

The Mexican population is a heterogeneous mix of races/ethnicities with a very complex genetic structure including Native

American (51%), European (45.4%), and African (3.7%) alleles [61]. Therefore, to consider this heterogeneity the analysis was adjusted for this admixture using 10 informative ancestry markers, and the associations remained significant.

When we compared the distribution of *TNF- $\alpha$* -308A allele frequencies obtained from Mexican controls with other populations worldwide, we observed significant differences. The only comparisons without significant differences were with the Chilean, Iranian, and Taiwanese populations (Table 3) [25,34,35]. Similar results have been reported for the distribution of other SNPs [67,68,82]. This could be explained by the heterogeneity of the genetic background among populations. These observations support the need for replication studies among all ethnic groups, especially those with a high degree of heterogeneity, such as the Mexican population.

In conclusion, the results of this study demonstrate the association of the *TNF- $\alpha$* -308A allele as a common genetic risk factor for susceptibility to pediatric immune and/or inflammatory diseases in the Mexican population.

### Acknowledgments

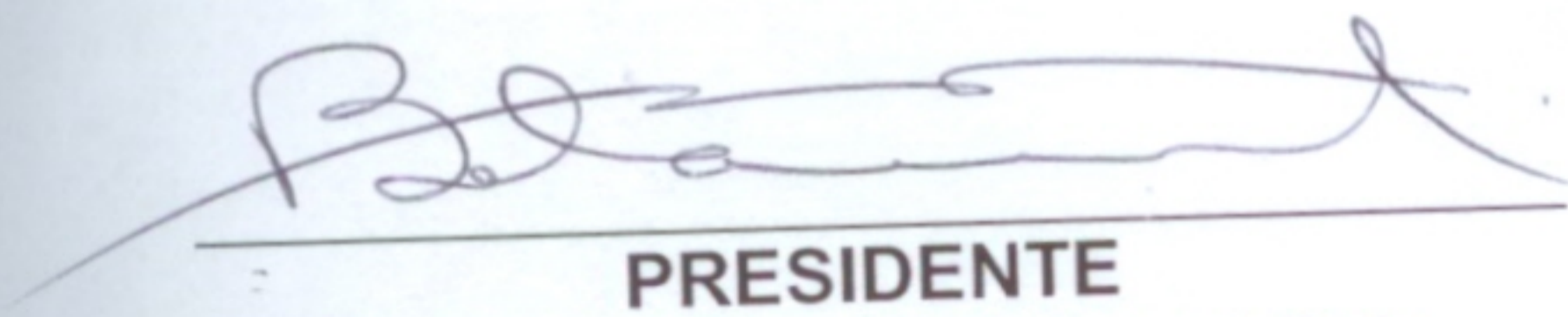
This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico (CONACyT: SALUD-2004-01-153, 2005-01-14143, 2005-01-14238 and the scholarship 153007 to S.J).

### References

- Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol* 1993;9:317–43.
- Rottem M, Gershwin ME, Shoenfeld Y. Allergic disease and autoimmune effector pathways. *Dev Immunol* 2002;9:161–7.
- Tayal V, Kalra BS. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics—an update. *Eur J Pharmacol* 2008;579:1–12.
- Kollias G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D. The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Ann Rheum Dis* 1999;58:132–9.
- Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008;214:149–60.
- Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: Players, rules and the games. *Immunology* 2005;115:1–20.
- Thomas PS. Tumour necrosis factor- $\alpha$ : The role of this multifunctional cytokine in asthma. *Immunol Cell Biol* 2001;79:132–40.
- Aringer M, Smolen JS. SLE—complex cytokine effects in a complex autoimmune disease: Tumor necrosis factor in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2003;5:172–7.
- Brennan FM, Chantry D, Jackson AM, Maini RN, Feldmann M. Cytokine production in culture by cells isolated from the synovial membrane. *J Autoimmun* 1989;2:177–86.
- Sharma S, Sharma A, Kumar S, Sharma SK, Ghosh B. Association of TNF haplotypes with asthma, serum IgE levels, and correlation with serum TNF- $\alpha$  levels. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:488–95.
- Kim YS, Ko HM, Kang NI, Song CH, Zhang X, Chung WC, et al. Mast cells play a key role in the development of late airway hyperresponsiveness through TNF- $\alpha$  in a murine model of asthma. *Eur J Immunol* 2007;37:1107–15.
- Nakae S, Ho LH, Yu M, Monteforte R, Iikura M, Suto H, et al. Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:48–55.
- Kaijzel EL, van Krugten MV, Brinkman BM, Huizinga TW, van der Straaten T, Hazes JM, et al. Functional analysis of a human tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) promoter polymorphism related to joint damage in rheumatoid arthritis. *Mol Med* 1998;4:724–33.
- Raghav SK, Gupta B, Agrawal C, Chaturvedi VP, Das HR. Expression of TNF- $\alpha$  and related signaling molecules in the peripheral blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. *Mediators Inflamm* 2006;3:12682.
- Maury CP, Teppo AM. Tumor necrosis factor in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1989;32:146–50.
- Gabay C, Cakir N, Moral F, Roux-Lombard P, Meyer O, Dayer JM, et al. Circulating levels of tumor necrosis factor soluble receptors in systemic lupus erythematosus are significantly higher than in other rheumatic diseases and correlate with disease activity. *J Rheumatol* 1997;24:303–8.
- Carroll MC, Katzman P, Alicot EM, Koller BH, Geraghty DE, Orr HT, et al. Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:8535–9.
- Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992;1:353.
- Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H, et al. Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  gene in Japanese. *Tissue Antigens* 1998;51:605–12.
- Ugllaloro AM, Turbay D, Pesavento PA, Delgado JC, McKenzie FE, Gribben JG, et al. Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor- $\alpha$  gene promoter. *Tissue Antigens* 1998;52:359–67.
- Zúñiga J, Vargas-Alarcón G, Hernández-Pacheco G, Portal-Celhay C, Yamamoto-Furusho JK, Granados J. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Genes Immun* 2001;2:363–6.
- Rodríguez-Carreón AA, Zúñiga J, Hernández-Pacheco G, Rodríguez-Carreón AA, Zúñiga J, Hernández-Pacheco G, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  –308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. *J Autoimmun* 2005;24:63–8.
- Witte JS, Palmer LJ, O'Connor RD, Hopkins PJ, Hall JM. Relation between tumour necrosis factor polymorphism TNF $\alpha$ -308 and risk of asthma. *Eur J Hum Genet* 2002;10:82–5.
- Zhu S, Chan-Yeung M, Becker AB, Dimich-Ward H, Ferguson AC, Manfreda J, et al. Polymorphisms of the IL-4, TNF $\alpha$ , and Fc $\epsilon$ R1b genes and the risk of allergic disorders in at-risk infants. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1655–9.
- Cuenca J, Cuchacovich M, Pérez C, Ferreira L, Aguirre A, Schiattino I, et al. The –308 polymorphism in the tumour necrosis factor (TNF) gene promoter region and ex vivo lipopolysaccharide-induced TNF expression and cytotoxic activity in Chilean patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2003;42:308–13.
- Correa PA, Gomez LM, Cadena J, Anaya JM. Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism. *J Rheumatol* 2005;32:219–24.
- Beghe B, Padoan M, Moss CT, Barton SJ, Holloway JW, Holgate ST, et al. Lack of association of HLA class I genes and TNF alpha-308 polymorphism in toluene diisocyanate-induced asthma. *Allergy* 2004;59:61–4.
- Suárez A, López P, Mozo L, Gutiérrez C. Differential effect of IL10 and TNF[alpha] genotypes on determining susceptibility to discoid and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1605–10.
- Winchester EC, Millwood IY, Rand L, Penny MA, Kessler AM. Association of the TNF- $\alpha$ -308 (G/A) polymorphism with self-reported history of childhood asthma. *Hum Genet* 2000;107:591–6.
- Louis R, Leyder E, Malaise M, Bartsch P, Louis E. Lack of association between adult asthma and the tumour necrosis factor alpha-308 polymorphism gene. *Eur Respir J* 2000;16:604–8.
- Padyukov L, Hahn-Zoric M, Lau YL, Hanson LA. Different allelic frequencies of several cytokine genes in Hong Kong Chinese and Swedish Caucasians. *Genes Immun* 2001;2:280–3.
- Ozen S, Alikasifoglu M, Bakkaloglu A, Duzova A, Jarosova K, Nemcova D, et al. Tumour necrosis factor alpha G $\rightarrow$ A –238 and G $\rightarrow$ A –308 polymorphisms in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology* 2002;41:223–7.
- Aoki T, Hirota T, Tamari M, Ichikawa K, Takeda K, Arinami T, et al. An association between asthma and TNF-308G/A polymorphism: Meta-analysis. *Eur J Hum Genet* 2006;51:677–85.
- Kamali-Sarvestani E, Ghayomi MA, Nekoe A. Association of TNF- $\alpha$  –308 G/A and IL-4 –589 C/T gene promoter polymorphisms with asthma susceptibility in the south of Iran. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007;17:361–6.
- Huang SL, Su CH, Chang SC. Tumor necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphism in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1436–39.
- Shin HD, Park BL, Kim LH, et al. Association of tumor necrosis factor polymorphisms with asthma and serum total IgE. *Hum Mol Genet* 2004;13:397–403.
- Parks CG, Pandey JP, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS, et al. Genetic polymorphisms in tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and TNF- $\beta$  in a population-based study of systemic lupus erythematosus: Associations and interaction with the interleukin-1 $\alpha$ -889 C/T polymorphism. *Hum Immunol* 2004;65:622–31.
- Wang TN, Chen WY, Wang TH, Chen CJ, Huang LY, Ko YC. Gene–gene synergistic effect on atopic asthma: Tumour necrosis factor- $\alpha$ -308 and lymphotoxin-a-NcoI in Taiwan's children. *Clin Exp Allergy* 2004;34:184–8.
- Natividad A, Hanchard N, Holland MJ, Mahdi OS, Diakite M, Rockett K, et al. Genetic variation at the TNF locus and the risk of severe sequelae of ocular Chlamydia trachomatis infection in Gambians. *Genes Immun* 2007;8:288–95.
- Moffatt MF, Cookson WO. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genet* 1997;6:551–4.
- Knight JC. Functional implications of genetic variation in non-coding DNA for disease susceptibility and gene regulation. *Clin Sci (Lond)* 2003;104:493–501.
- Bayley JP, Ottenhoff TH, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun* 2004;5:315–29.
- Wilson AG, Symons JA, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3195–9.
- Glossop JR, Dawes PT, Nixon NB, Matthey DL. Polymorphism in the tumour necrosis factor receptor II gene is associated with circulating levels of soluble tumour necrosis factor receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R1227–34.
- Jeong P, Kim EJ, Kim EG, Byun SS, Kim CS, Kim WJ. Association of bladder tumors and GA genotype of –308 nucleotide in tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter with greater tumor necrosis factor- $\alpha$  expression. *Urology* 2004;64:1052–6.
- Sharma S, Sharma A, Kumar S, Sharma SK, Ghosh B. Association of TNF haplotypes with asthma, serum IgE levels, and correlation with serum TNF- $\alpha$  levels. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:488–495.

- [47] Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS) stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998;113:401–6.
- [48] Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavakli K, Berntorp E, Lefvert AK. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 2006;108:3739–45.
- [49] Gao J, Shan G, Sun B, Thompson PJ, Gao X. Association between polymorphism of tumour necrosis factor alpha-308 gene promoter and asthma: A meta-analysis. *Thorax* 2006;61:466–71.
- [50] Lee YH, Harley JB, Nath SK. Meta-analysis of TNF-alpha promoter -308 A/G polymorphism and SLE susceptibility. *Eur J Hum Genet* 2006;14:364–71.
- [51] Lee YH, Ji JD, Song GG. Tumor necrosis factor-alpha promoter -308 A/G polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility: A metaanalysis. *J Rheumatol* 2007;34:43–9.
- [52] Wilson AG, de Vries N, van de Putte LB, Duff GW. A tumour necrosis factor alpha polymorphism is not associated with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1995;54:601–3.
- [53] Chen CJ, Yen JH, Tsai WC, Wu CS, Chiang W, Tsai JJ, et al. The TNF2 allele does not contribute towards susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett* 1997;55:1–3.
- [54] Di Somma C, Charron D, Deichmann K, Buono C, Ruffilli A. Atopic asthma and TNF -308 alleles: Linkage disequilibrium and association analyses. *Hum Immunol* 2003;64:359–65.
- [55] Rudwaleit M, Tikly M, Khamashta M, Gibson K, Klinke J, Hughes G, et al. Interethnic differences in the association of tumor necrosis factor promoter polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1996;23:1725–8.
- [56] Soto-Vega E, Richaud-Patin Y, Llorente L. Human leukocyte antigen class I, class II, and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in a healthy elder Mexican Mestizo population. *Immun Ageing* 2005 Nov 3;2:13.
- [57] Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodriguez-Cruz M, et al. The ABCA1 R230C variant affects hdl-cholesterol levels and body mass index in the Mexican population: Association with obesity and obesity-related comorbidities. *Diabetes* 2007;56:1881–7.
- [58] Villalobos-Comparán M, Teresa Flores-Dorantes M, Teresa Villarreal-Molina M, et al. The FTO gene is associated with adulthood obesity in the Mexican population. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:2296–301.
- [59] Hoggart CJ, Parra EJ, Shriver MD, Bonilla C, Kittles RA, Clayton DG, McKeigue PM. Control of confounding of genetic associations in stratified populations. *Am J Hum Genet* 2003;72:1492–1504.
- [60] Bonilla C, Parra EJ, Pfaff CL, Dios S, Marshall JA, Hamman RF, et al. Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado, and its implications for complex trait gene mapping. *Ann Intern Med* 2004;68:139–53.
- [61] Choudhry S, Coyle NE, Tang H, Salari K, Lind D, Clark SL, et al. Population stratification confounds genetic association studies among Latinos. *Hum Genet* 2006;118:652–64.
- [62] Liang TC, Yang YH, Lin YT, Chiang BL. Treatment with etanercept for patients with juvenile rheumatoid arthritis in Taiwan—a preliminary report. *J Microbiol Immunol Infect* 2005;38:447–50.
- [63] Howarth PH, Babu KS, Arshad HS, Lau L, Buckley M, McConnell W, et al. Tumour necrosis factor (TNF)alpha as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. *Thorax* 2005;60:1012–8.
- [64] Aringer M, Graninger WB, Steiner G, Smolen JS. Safety and efficacy of tumor necrosis factor alpha blockade in systemic lupus erythematosus: An open-label study. *Arthritis Rheum* 2004;50:3161–9.
- [65] Aringer M, Steiner G, Graninger WB, Höfler E, Steiner CW, Smolen JS. Effects of short-term infliximab therapy on autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2007;56:274–9.
- [66] Wu H, Romieu I, Sienra-Monge JJ, Del Rio-Navarro BE, Anderson DM, Dunn EW, et al. Smoking modifies the relation between genetic variation in tumor necrosis factor-alpha (TNF) and childhood asthma. *Environ Health Perspect* 2007;115:616–22.
- [67] Reddy MV, Velázquez-Cruz R, Baca V, Lima G, Granados J, Orozco L, et al. Genetic association of IRF5 with SLE in Mexicans: Higher frequency of the risk haplotype and its homozygosity than Europeans. *Hum Genet* 2007;121:721–7.
- [68] Velázquez-Cruz R, Orozco L, Espinosa-Rosales F, Carreño-Manjarrez R, Solís-Vallejo E, López-Lara ND, et al. Association of PDCD1 polymorphisms with childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet* 2007;15:336–41.
- [69] Milterski B, Drynda S, Böschow G, Klein W, Oppermann J, Kekow J, et al. Complex genetic predisposition in adult and juvenile rheumatoid arthritis. *BMC Genet* 2004;5:2.
- [70] Modesto C, Patiño-García A, Sotillo-Piñero E, Merino J, García-Consuegra J, Merino R, et al. TNF-alpha promoter gene polymorphisms in Spanish children with persistent oligoarticular and systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Scand J Rheumatol* 2005;34:451–4.
- [71] Chang JC, Liu CA, Chuang H, Ou CY, Hsu TY, Huang EY, et al. Gender-limited association of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) polymorphism with cord blood IgE levels. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15:506–512.
- [72] Hajeer A, John S, Ollier WE, Silman AJ, Dawes P, Hassell A, et al. Tumor necrosis factor microsatellite haplotypes are different in male and female patients with RA. *J Rheumatol* 1997;24:217–9.
- [73] Yamada R, Tanaka T, Unoki M, Nagai T, Sawada T, Ohnishi Y, et al. Association between a single-nucleotide polymorphism in the promoter of the human interleukin-3 gene and rheumatoid arthritis in Japanese patients, and maximum-likelihood estimation of combinatorial effect that two genetic loci have on susceptibility to the disease. *Am J Hum Genet* 2001;68:674–85.
- [74] Fisher SA, Hampe J, Macpherson AJ, Forbes A, Lennard-Jones JE, Schreiber S, et al. Sex stratification of an inflammatory bowel disease genome search shows male-specific linkage to the HLA region of chromosome 6. *Eur J Hum Genet* 2002;10:259–65.
- [75] Akkad DA, Arning L, Ibrahim SM, Epplen JT. Sex specifically associated promoter polymorphism in multiple sclerosis affects interleukin 4 expression levels. *Genes Immun* 2007;8:703–6.
- [76] Granados J, Vargas-Alarcón G, Andrade F, et al. The role of HLA-DR alleles and complotypes through the ethnic barrier in systemic lupus erythematosus in Mexicans. *Lupus* 1996;5:184–9.
- [77] Yamamoto-Furusho JK, Uscanga LF, Vargas-Alarcón G, Rodríguez-Pérez JM, Zuñiga J, Granados J. Polymorphisms in the promoter region of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and the HLA-DRB1 locus in Mexican mestizo patients with ulcerative colitis. *Immunol Lett* 2004;95:31–5.
- [78] Vargas-Alarcón G, Casasola-Vargas J, Rodríguez-Pérez JM, Huerta-Sil G, Pérez-Hernández N, Londoño J, et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthritis. *Hum Immunol* 2006;67:826–32.
- [79] Wong AM, Allcock RJ, Cheong KY, Christiansen FT, Price P. Alleles of the proximal promoter of BAT1, a putative anti-inflammatory gene adjacent to the TNF cluster reduce transcription on a disease-associated MHC haplotype. *Genes Cells* 2003;8:403–12.
- [80] Garavito G, Malagón C, Ramírez LA, De La Cruz OF, Uribe O, Navarro E, Iglesias A, Martínez P, Jaraquemada D, Egea E. [Polymorphism of human HLA-DRB1 leukocyte antigen alleles and its association to juvenile rheumatoid arthritis in a sample of Colombian mestizo children] *Biomedica* 2003;23:254–62.
- [81] Granados J, Vargas-Alarcón G, Andrade F, et al. The role of HLA-DR alleles and complotypes through the ethnic barrier in systemic lupus erythematosus in Mexicans. *Lupus* 1996;5:184–9.
- [82] Bekker-Mendez C, Yamamoto-Furusho JK, Vargas-Alarcón G, Ize-Ludlow D, Alcocer-Varela J, Granados J. Haplotype distribution of class II MHC genes in Mexican patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 1998;27:373–6.

Los miembros del jurado de examen designados por el Posgrado de Biología Experimental, abajo firmantes, aprobaron la tesis "**IDENTIFICACIÓN DE SNPs EN GENES INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA INMUNE E INFLAMATORIA ASOCIADOS A ASMA INFANTIL**" desarrollada por la M. en B.E. Silvia Jiménez Morales quien realizó la disertación pública el 17 de Diciembre de 2009 en las Instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.



**PRESIDENTE**

Dr. José Miguel Betancourt Rule  
Área de Biología Celular y Molecular  
Depto. de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana



**SECRETARIO**

Dr. Enrique Miranda Peralta  
Lab. de Biología Molecular,  
Servicio de Hematología  
Hospital General de México



**VOCAL**

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura  
Depto. de Biología de la Reproducción  
Universidad Autónoma Metropolitana



**VOCAL**

Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza  
Lab. de Biología Molecular,  
Depto. de Invest. en Genética Humana.  
Instituto Nacional de Pediatría