
UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD
DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**“IDENTIFICACIÓN DE LA MUTACIÓN Δ F508 EN EL GEN
CFTR Y DE SNPs EN GENES CANDIDATOS Y SU
ASOCIACIÓN CON ASMA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS
MEXICANOS”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

Presenta

Biol. Exp. Rehotbevely Barrientos Rios

Director de tesis

Dra. Lorena Orozco O.

México D.F. Agosto de 2008

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

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

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

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD
DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**“IDENTIFICACIÓN DE LA MUTACIÓN Δ F508 EN EL GEN
CFTR Y DE SNPs EN GENES CANDIDATOS Y SU
ASOCIACIÓN CON ASMA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS
MEXICANOS”**

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

PRESENTA

Biol. Exp. Rehotbevely Barrientos Rios

Director de tesis

Dra. Lorena Orozco

Asesores:

Dr. Humberto Nicolini

Dr. Abraham Majluf

Dra. Minerva Camacho Nuez

Dra. Maria Elizabeth Álvarez Sánchez

Este estudio fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de investigación en Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría en colaboración con el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), bajo la dirección general de la Dra. Lorena Orozco, Investigadora del INMEGEN y la asesoría del Dr. Humberto Nicolini, Profesor de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) y el Dr. Abraham Majluf Investigador del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Mención especial a los profesores de la UACM por sus enseñanzas, y confianza y a la UACM por el apoyo económico que me brindó durante mis estudios de Maestría. Gracias por darme la oportunidad de formar orgullosamente parte de la primera generación del Posgrado en Ciencias Genómicas y permitirme ser testigo del crecimiento y éxito que ha logrado dicho posgrado en tan poco tiempo. **Por siempre mil gracias.**

Dedicado a:

Noely L. Flores Barrientos

Eres un chispazo de creación,

eres la mejor sorpresa de mi vida,

eres mi vida e inspiración

Te amo

Rosalina Ríos Navarrete

Eres la mujer que admiro, eres mi pilar, mi mejor amiga. Gracias por todos tus consejos, confianza y amor que siempre has depositado en mi. Gracias por apoyarme en todo lo que realizo. Gracias Mami.

Agradecimiento:

Con un agradecimiento muy especial e infinito a la Dra. Lorena Orozco por darme la oportunidad y el privilegio de trabajar bajo su dirección, además de ser una persona digna de admirarse, respetarse y un gran ejemplo a seguir.

Silvia:

Tu que fuiste una guía durante mi desempeño en el laboratorio y por compartir tus conocimientos.

Margarita

Gracias por tu apoyo incondicional y por tus valiosos consejos.

Rafael:

Gracias por tu ayuda durante toda mi estancia en el laboratorio, ya que con tus observaciones y bromas la labor fue mas amena.

Gracias a todos los integrantes del laboratorio en su momento, ya que me hicieron sentir muy bien

Yolanda, Ricardo, Araceli, Lupita, Miguel Macias.

Un agradecimiento infinito a la Dra. Ariadna González del Ángel, por apoyarme en todo este tiempo y las facilidades otorgadas para el desarrollo del escrito de la Tesis y al Dr. Miguel Ángel Alcantara por compartir siempre sus valiosos conocimientos incondicionalmente..

A mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular actual

Que siempre me recordaban de terminar lo que empecé

José, Carlos, Cecy, Luz, Víctor

INDICE

Dedicatoria	-----	III
Agradecimientos	-----	IV
Abreviaturas	-----	VIII-IX
Lista de Tablas	-----	X-XI
Lista de Figuras	-----	XII
Resumen	-----	1
Antecedentes	-----	3
Fisiopatología del asma	-----	4
Clasificación del asma	-----	4-9
Diagnóstico clínico	-----	11-13
Gravedad del asma crónica	-----	14
Componente genético del asma	-----	15-17
Polimorfismos	-----	18-20
Genes candidatos		
Gen <i>TNF-α</i>	-----	22
Gen del receptor β_2 adrenérgico	-----	26
Gen <i>CFTR28</i>	-----	28
Justificación	-----	30
Objetivo General	-----	31
Objetivos particulares	-----	31
Hipótesis	-----	32
Definiciones Operacionales	-----	33

Material y Métodos

Clasificación de la investigación -----	35
Población de estudio -----	35
Estrategia general -----	37
Extracción de sangre periférica -----	38

Análisis Molecular

Análisis de la mutación $\Delta F508$ -----	43-44
Genotipificación de SNPs en genes candidatos -----	46

Análisis Estadístico -----	47
----------------------------	----

Resultados

Análisis de la mutación $\Delta F508$ -----	48-49
Análisis de los polimorfismos en el gen <i>ADRB2</i> -----	50-60
Análisis de los polimorfismos en el gen <i>TNF-α</i> -----	62-70

Discusión -----	71-76
-----------------	-------

Conclusión -----	77
------------------	----

Referencia -----	78-84
------------------	-------

ABREVIATURAS

ADRB2	Receptor beta 2 adrenérgico
Arg	Arginina
CPA	Células presentadores de antígenos
DC	Dicigoto
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTP	Deoxinucleótidos trifostato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etile-diamino-tetracético
FEV1	Volumen espiratorio forzado por un segundo
FVC	Capacidad vital forzada
GINA	Iniciativa Global del Asma
Gln	Glutamina
Glu	Acido Glutámico
Gly	Glicina
HBR	Hiperrespuesta bronquial
IgE	Inmunoglobulina E
INF-α	Interferón alpha
INP	Instituto Nacional de Pediatría
/SAAC	Estudio Internacional de Asma y Alergias en la Niñez
Kb	Kilobases

MC	Monocito
Nm	Nanómetro
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PF	Pico máximo de flujo en una espiración forzada
RFLP	Fragmento de restricción de longitud polimórfica
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
STR	Repetidos cortos en tandem
TBE	Buffer de Tris-Borato
TDT	Prueba de desequilibrio de transmisión
<i>TNF-α</i>	Factor de necrosis tumoral
UV	Luz ultravioleta
VNTR	Repetidos en tandem de número variable

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Gravedad del asma crónica -----	14
Tabla 2.	Mutaciones y polimorfismos en genes candidatos para la susceptibilidad del asma -----	23
Tabla 3.	Genes candidatos que se asocian al asma en diferentes Poblaciones -----	24
Tabla 4.	Oligonucleótidos utilizados para la detección de la mutación $\Delta F508$ -----	45
Tabla 5.	Condiciones de la PCR para la detección de la mutación $\Delta F508$ -----	45
Tabla 6.	Frecuencia genotípica del polimorfismo Arg16Gly del gen <i>ADRB2</i> en una muestra de pacientes mexicanos con asma -----	53
Tabla 7	Frecuencias alélicas del polimorfismo Arg16Gly del gen <i>ADRB2</i> en pacientes mexicanos con diagnostico de asma -----	54
Tabla 8	Frecuencias genotípicas del polimorfismo Gln27Glu del gen <i>ADRB2</i> en pacientes mexicanos diagnosticados con asma -----	55
Tabla 9	Frecuencia alélica del polimorfismo Gln27Glu del gen <i>ADRB2</i> en pacientes mexicanos diagnosticados con asma -----	56
Tabla 10	Distribución de genotipos del gen <i>ADRB2</i> en pacientes mexicanos con diagnostico de asma -----	57
Tabla 11	Polimorfismos en el gen <i>ADRB2</i> y la gravedad del asma en pacientes mexicanos -----	59

Tabla 12	Frecuencias de haplotipos en el gen <i>ADRB2</i> en pacientes con diagnóstico de asma -----	61
Tabla 13	Frecuencia genotípicas del polimorfismo -238 localizado en la región promotora del gen <i>TNF-α</i> -----	63
Tabla 14	Frecuencia alélica del polimorfismo -238 localizado en la región promotora del gen <i>TNF-α</i> -----	64
Tabla 15	Frecuencias genotípicas del polimorfismo -308 localizado en la región promotora del gen <i>TNF-α</i> . -----	65
Tabla 16	Frecuencias alélicas del polimorfismo -308 localizado en la región promotora del gen <i>TNF-α</i> -----	66
Tabla 17	Distribución de genotipos en el gen <i>TNF-α</i> -----	69
Tabla 18	Polimorfismos en el gen <i>TNF-α</i> y la gravedad de la enfermedad--	69
Tabla 19	Frecuencia de haplotipos en el gen <i>TNF-α</i> -----	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	La fisiología del asma -----	7
Figura 2	El asma se caracteriza principalmente por tener una respuesta de tipo Th2 -----	10
Figura 3	Espirometría forzada -----	12
Figura 4	Evidencias de la participación de los factores genéticos -----	16
Figura 5	El asma es una enfermedad compleja -----	19
Figura 6	El gen <i>TNF-α</i> -----	25
Figura 7	El receptor β 2 adrenérgico -----	27
Figura 8	Localización del gen <i>CFTR</i> en el cromosoma 7 -----	29
Figura 9	Estrategia general -----	37
Figura 10	Amplificación de la mutación Δ F508-----	49
Figura 11	Análisis de la mutación Δ F508 en pacientes con asma -----	49
Figura 12	Discriminación Alélica de <i>ADRB2</i> (Gln27Glu) mediante el método de TaqMan. -----	51

RESUMEN

El asma, definida como un trastorno inflamatorio crónico de las vías respiratorias, es la enfermedad crónica más común en países industrializados. En México se calcula que existe una población de cerca de 10 millones de pacientes asmáticos. Esta entidad es una enfermedad multifactorial, ya que su desarrollo depende de la interacción de factores genéticos y ambientales. La participación de los factores genéticos en la patogénesis del asma fue evidenciada mediante estudios en familias y estudios en gemelos. Estos han mostrado que el riesgo de los familiares de primer grado a desarrollar asma es 4 veces mayor que lo observado en la población general, así mismo, la concordancia entre gemelos monocigotos es de hasta un 70%. La búsqueda de los factores genéticos involucrados en la etiopatogénesis del asma ha permitido la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en genes que participan en la respuesta inflamatoria e inmune (*TNF- α*) y en genes involucrados en el metabolismo de drogas (*ADRB2*). Por otra parte, también se ha sugerido la participación de mutaciones en genes implicados en la fisiología del pulmón, como la mutación $\Delta F508$ del gen *CFTR*. Estos estudios también han mostrado que las variaciones en la gravedad y prevalencia de esta entidad, observada entre los distintos grupos étnicos, se derivan de la participación diferencial de los polimorfismos y de su efecto aditivo; por lo que la identificación de los genes asociados a esta patología en cada población es indispensable para desarrollar estrategias moleculares que contribuyan a identificar los individuos en riesgo a desarrollar asma y que permitan el diseño de esquemas de tratamiento más específicos para cada paciente. El objetivo de esta tesis fue "Identificar mutaciones y polimorfismos en genes candidatos y su asociación con asma en pacientes pediátricos mexicanos". Este proyecto es un estudio de casos y controles en el que se incluyeron 90 pacientes pediátricos con diagnóstico clínico de asma y 250 controles sin antecedentes de asma y atopia. El análisis molecular de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu del gen *ADRB2* y $-308A/G$ y $-238A/G$ del gen *TNF- α* se realizó mediante TaqMan, mientras que la identificación de la

mutación $\Delta F508$ del gen *CFTR* se llevó a cabo por medio de mutagénesis dirigida mediada por PCR. Cuando se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu del gen *ADRB2*, y de los polimorfismos -308G/A y -238G/A del gen *TNF- α* entre casos y controles, el análisis estadístico (prueba de X^2) no mostró diferencias significativas ($P_{0.05} > 0.05$). Sin embargo, al comparar las frecuencias de los genotipos entre los diferentes grados de gravedad del asma se observó una asociación entre el genotipo GG/CG del gen *ADRB2* y asma persistente moderada ($P_{0.05} = 0.002$). Así mismo, en el análisis de polimorfismos del gen *TNF- α* se encontró que el genotipo AA/GA es más frecuente en los casos que en los controles (13% vs 6%, $P = 0.039$). Nuestros resultados sugieren que tanto *ADRB2* como *TNF- α* podrían estar participando en la etiopatogenia del asma en la población mexicana. Por otra parte apoya la hipótesis de que los SNPs estudiados tienen un efecto aditivo en el desarrollo de la enfermedad. La mutación $\Delta F508$ no se identificó en ninguno de los paciente analizados en este estudio, sugiriendo que el gen *CFTR* no participa en la etiología del asma en pacientes mexicanos.

No obstante, es necesario el análisis con un mayor número de casos, así como de otros genes candidatos para identificar las variantes que participan en el desarrollo del asma en la población infantil de nuestro país.

ANTECEDENTES

El asma es un padecimiento cuya incidencia ha incrementado en los últimos años en forma considerable, principalmente en los niños. El asma se ha convertido en una epidemia a nivel mundial, afectando alrededor de 300 millones de individuos. Esta entidad es de las enfermedades atópicas más frecuentes y se calcula que existen entre 10 a 15% de individuos afectados en el mundo (Von Mutius y cols; 2003), aunque existen varios estudios que reportan cifras superiores (GINA; 2002). En Brasil se estima que el asma tiene una prevalencia de 7.3% en niños y 4.9% en niñas, sin embargo se cree que ésta está subestimada y es posible que alcance hasta el 23% y 20.4% respectivamente; en la India los resultados son similares (Cobos, 2002), mientras que en la ciudad de New York se estima hasta de 38% en un estrato socioeconómico bajo y en Suiza se diagnostica de 9.1% contra la posibilidad real de 16.5% (García y cols 2002).

Por lo anterior, es posible que exista un subdiagnóstico de esta patología en el mundo incluyendo a México (García y cols, 2002; CASEIC, 2002; National Asthma Education and Prevention Program; 2000, Cobos, 2002; GINA, 2002; Rico-Méndez y cols, 2000). En un estudio realizado en el 2004 por el ISAAC (Estudio Internacional de Asma y Alergias en la Niñez) donde se incluyeron 257,800 niños entre los 6 y 7 años de edad y 463,801 adolescentes entre los 13 y 14 años de edad procedentes de 56 países, se observó que Australia, Nueva Zelanda, Brasil, Costa Rica, Republica de Panamá y México tenían la mayor prevalencia del asma.

Por otro lado, aún cuando existen grandes avances en el diagnóstico del asma un alto porcentaje de pacientes muere a causa de la enfermedad, de hecho

en Estados Unidos ocurren aproximadamente 5,000 muertes al año por asma (GSGA, 2002). Es importante señalar que la prevalencia y la gravedad de esta patología varía entre los diferentes grupos étnicos; sin embargo el incremento en su incidencia y mortalidad, es una observación mundial (Rico-Méndez y cols, 2000).

FISIOLOGÍA DEL ASMA

El asma es una entidad muy compleja y de origen multifactorial que se define como un trastorno inflamatorio crónico de las vías respiratorias (Tanaka y cols, 2002) y se caracteriza por hiperactividad de las vías aéreas que se manifiesta como episodios de tos, disnea, opresión torácica y estertores sibilantes. Estos síntomas pueden ser explicados por los diferentes cambios inflamatorios observados en pulmones de asmáticos como son:

Lesión epitelial

La lesión epitelial se caracteriza por la fragilidad y desprendimiento de las células epiteliales y presenta correlación con la reactividad de la vía aérea, lo que parece indicar una relación directa con la gravedad del asma (Laitinen y cols, 1985) (Fig. 1).

Las células epiteliales pueden ser activadas por mecanismos IgE dependientes como virus, contaminación o mediadores proinflamatorios tales como la histamina. Una vez que esto ocurre, las células epiteliales liberan una gran cantidad de mediadores por ejemplo citocinas, eotaxina, factores de crecimiento, proteínas de

matriz extracelular, fibronectina, endotelina, ON-sintetasa etc., los cuales promueven la obstrucción bronquial, perpetúan la inflamación y colaboran en la remodelación bronquial (Nakamura, 1995).

Engrosamiento de la membrana basal reticular

La membrana basal donde descansa el epitelio, se compone de dos capas: la lámina basal propiamente dicha y la lámina reticular. El engrosamiento de la lámina reticular es un hallazgo temprano y típico en los bronquios de los asmáticos (Fig. 1). Lo anterior se debe a la deposición de colágena I y III así como fibronectina, pero no de colágena tipo V y VII ni de laminina, propio de otras enfermedades. No se ha podido esclarecer la relación entre este hallazgo con la gravedad, duración y origen del asma (Fig. 1).

Angiogénesis

Por debajo de la membrana basal existe una rica red de capilares que va desde las vías aéreas centrales hasta los bronquiolos periféricos. Terminan anastomosándose con los capilares pulmonares y drenando por las venas pulmonares. Las biopsias bronquiales de los asmáticos muestran un gran aumento de esta red capilar que contribuye también al engrosamiento de la pared bronquial (Li y cols, 1997). Diversos factores de crecimiento endotelial son los responsables de la angiogénesis inducida, lo que favorecen la extravasación y el edema (Fig. 1).

Infiltrado celular inflamatorio

Las células inflamatorias que se acumulan en la pared bronquial, regulan el proceso inflamatorio propio del asma (Cobos y cols, 2003) e inician el fenómeno de remodelación, (Fig. 1) liberando varias citocinas, entre ellas IL-4, IL-5 y el GM-CSF (Carrol y cols, 1997; Minshall y cols, 1998; Holgate y cols, 1999; Giovanni y cols, 2005). Las células involucradas en asma son los eosinófilos, linfocitos, macrófagos y células epiteliales (Fig. 1).

Eosinofilia

Aunque la infiltración eosinofílica es característica del asma, no es específica de esta enfermedad. La mayoría de los asmáticos alérgicos y no alérgicos muestran eosinofilia bronquial y la gravedad del asma correlaciona con el grado de activación de los eosinófilos. Las propiedades biológicas de los eosinófilos activados incluyen la liberación de productos altamente tóxicos, como la proteína catiónica eosinofílica (PCE), la neurotoxina derivada del eosinófilo, radicales libres de oxígeno, eicosanoides, citocinas con patrón Th2 y factores de crecimiento que inducen el desprendimiento de las células epiteliales y la contracción del músculo liso bronquial (Weller y cols, 1991) (Fig. 1).

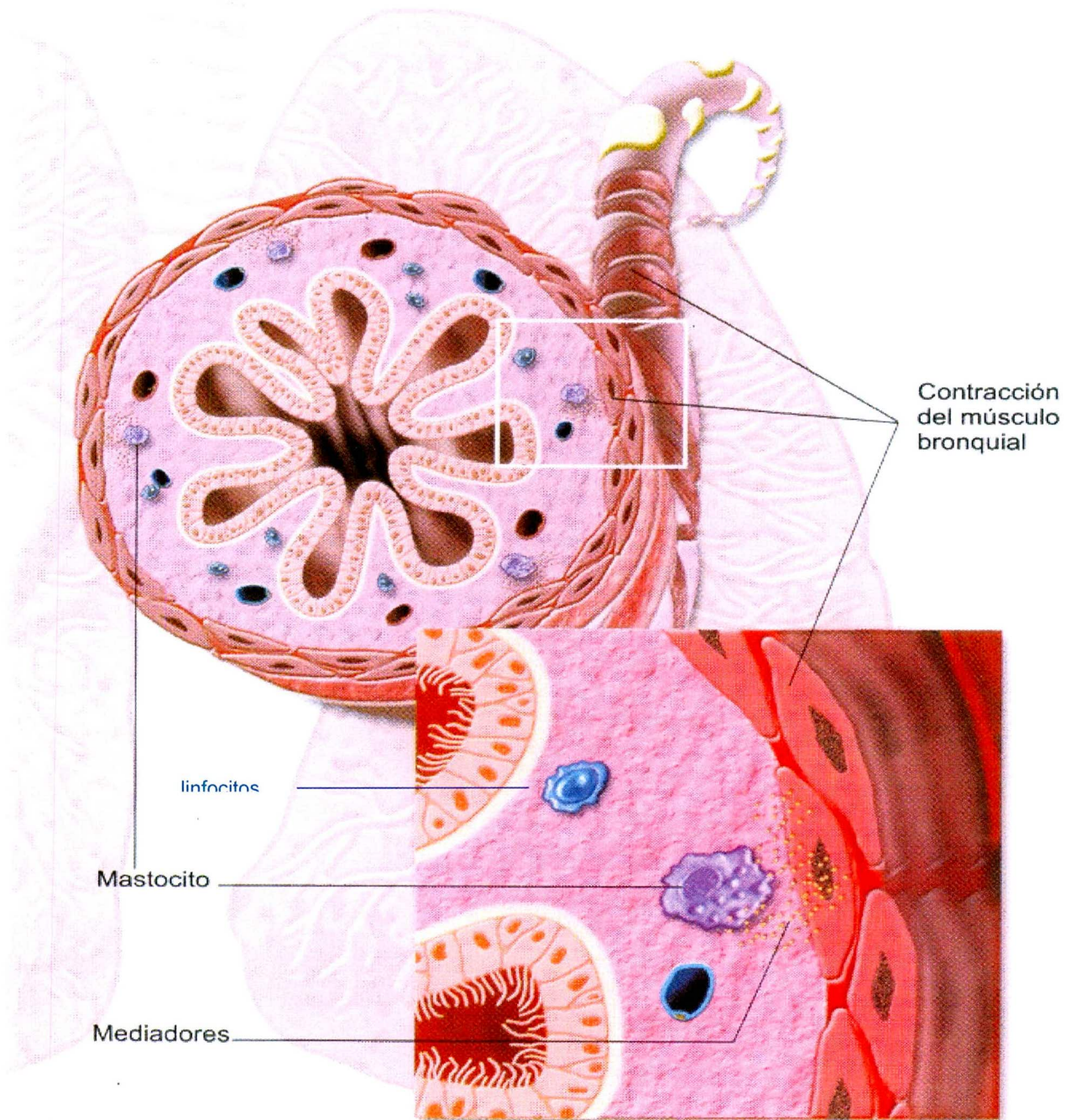


Figura 1. La Fisiopatología del asma. Como resultado de cambios estructurales en la pared bronquial que se agrupan bajo el término “remodelación de la vía aérea”,

existe un engrosamiento de la misma con una disminución permanente de su calibre y por tanto, con una limitación irreversible al flujo aéreo.

Linfocitosis

La infiltración de linfocitos CD4+, que al parecer tienen un importante papel en el control de la inflamación asmática alérgica y no alérgica mediante la liberación de citocinas Th2 , es propia de la mucosa bronquial de los asmáticos (Cobos y cols; 2003).

Mastocitosis

Los mastocitos representan las células diana en la crisis aguda del asma, ya que al unirse a los alérgenos mediante sus receptores de IgE específica de membrana, liberan histamina, eicosanoides y prostalandina D₂ (PGD₂) provocando la broncoconstricción, edema y secreción mucosa. Estas células también son capaces de liberar factores quimiotácticos y de proliferación de los fibroblastos (Welle y cols, 1997).

CLASIFICACIÓN INMUNOLÓGICA

Clásicamente esta patología se ha dividido en dos tipos: a) la intrínseca (no atópica) que es independiente de los alérgenos y se encuentra asociada principalmente al ejercicio, cambios de estado de ánimo y climáticos y b) la extrínseca (atópica) que se caracteriza por una respuesta de tipo Th2, comienza cuando el antígeno es captado y procesado por una célula presentadora de antígeno (APC), macrófagos, células B o las también llamadas células dendríticas, originando determinantes peptídicos antigénicos que se asocian a moléculas clase II del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad). El complejo péptido-CMH migra posteriormente a la superficie de la APC; después el complejo interactúa con el receptor de las células T que inducen la producción de IgE por las células B, una vez formada la interacción IgE alérgeno-específica, las IgE se unen a receptores de alta afinidad (Fc ϵ RI en mastocitos y basófilos) y de baja afinidad (Fc ϵ RII en eosinófilos y plaquetas) (Abbas y cols, 2000 y Ravetch y cols, 2000). Cuando se lleva a cabo esta interacción se induce la señal para que se inicie una reacción en cascada que conlleva a la liberación de mediadores de la inflamación y sustancias quimiotácticas (Fig. 2). La frecuencia de la enfermedad alérgica asociada con el asma varía del 50 al 90%, siendo mayor en los niños (Burrows y cols, 1989; Hoop y cols; 1990).

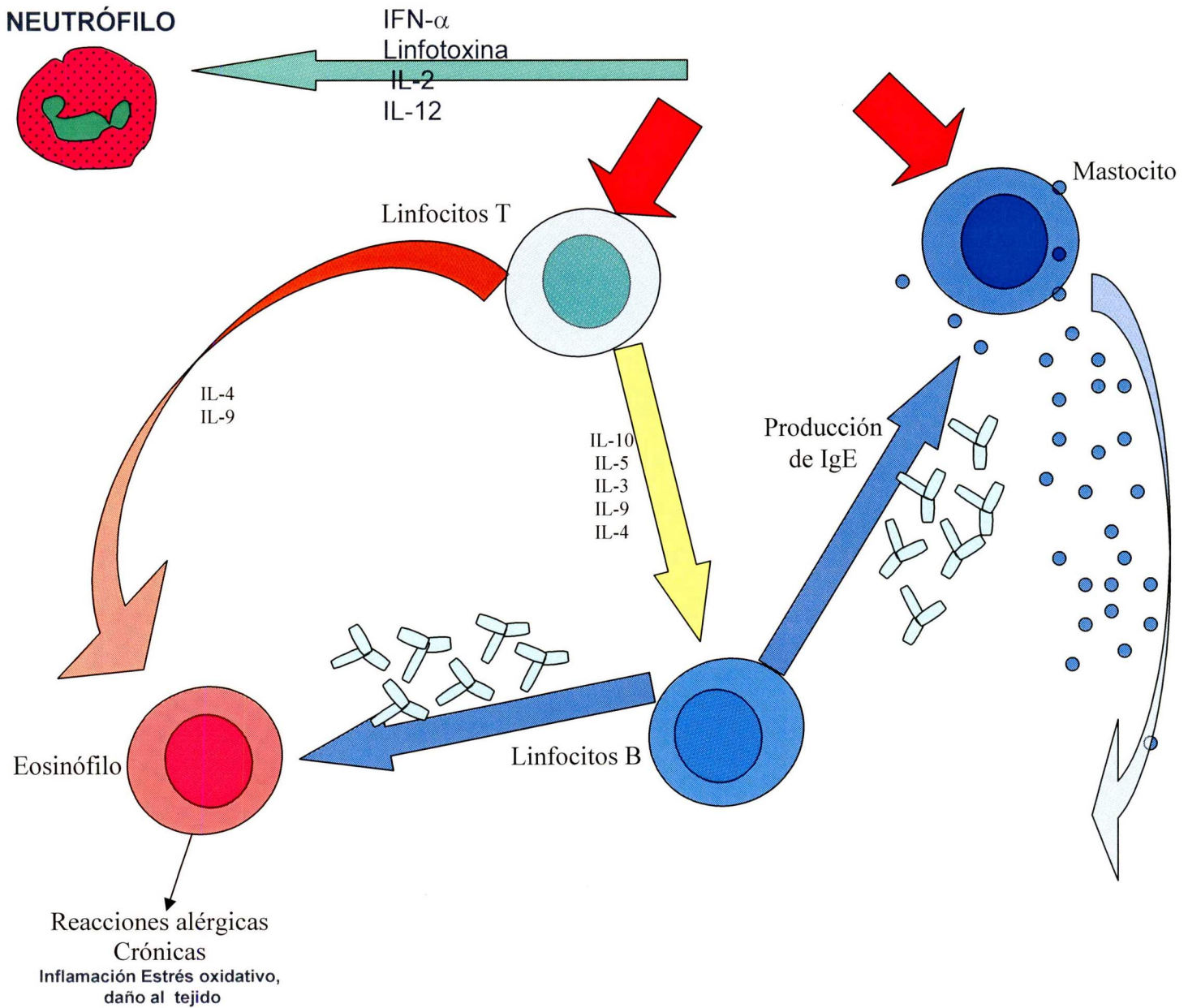


Figura 2. El asma se caracteriza principalmente por tener una respuesta de tipo Th2 y la respuesta alérgica inicia cuando un alérgeno activa a las células presentadoras de antígenos, estas células activan a los linfocitos Th0 hacia la expresión de citocinas de respuesta Th2 como la IL4 y la IL3. Los linfocitos Th2 secretan otras citocinas que activan a los neutrófilos, células B y eosinófilos, que inducen a un proceso inflamatorio, estrés oxidativo, daño al tejido, producción de IgE, vasodilatación, producción de moco y broncostricción.

DIAGNÓSTICO CLÍNICO

El diagnóstico del asma siempre se debe confirmar mediante pruebas de función respiratoria que demuestren la obstrucción bronquial al flujo aéreo y el carácter reversible de la misma. Las pruebas más importantes a realizar descritas por Frias y Cols; 2001, son:

La espirometría forzada la cual es la “prueba de oro” en el diagnóstico del asma. Se debe de realizar a todo niño con sospecha de asma en el momento del diagnóstico y posteriormente un control anual, sobre todo en el asma moderada-grave (CSGA, 2002). Esta prueba mide el volumen de aire exhalado durante una maniobra de espiración forzada, a partir de una inspiración máxima. Las variables principales a valorar son:

- FVC o capacidad vital forzada: Volumen total de aire que puede ser exhalado.
- FEV1 o VEMS: Volumen espiratorio máximo en el 1^{er} segundo de la FVC.
- PF o *peak-flow*: Pico máximo de flujo en una espiración forzada. Mide las grandes vías aéreas.
- FEV1/FVC
- FEF 25-75% o mesoflujos: Flujo espiratorio forzado entre el 25 y el 75% de la FVC. Mide las pequeñas vías aéreas.

Si hay un patrón obstructivo tendremos FVC normal o disminuida. FEV1 <80%, FEF 25-75% <65%.

Cabe mencionar que en el asma se puede encontrar una espirometría normal o un patrón obstructivo de las grandes vías aéreas (FEV1<80%), de las pequeñas (FEV 25-75<65%) o de ambas (Fig. 3), dependiendo de la gravedad de la enfermedad y de la fase en que se encuentre el paciente en ese momento (intercrisis, exacerbación etc.).

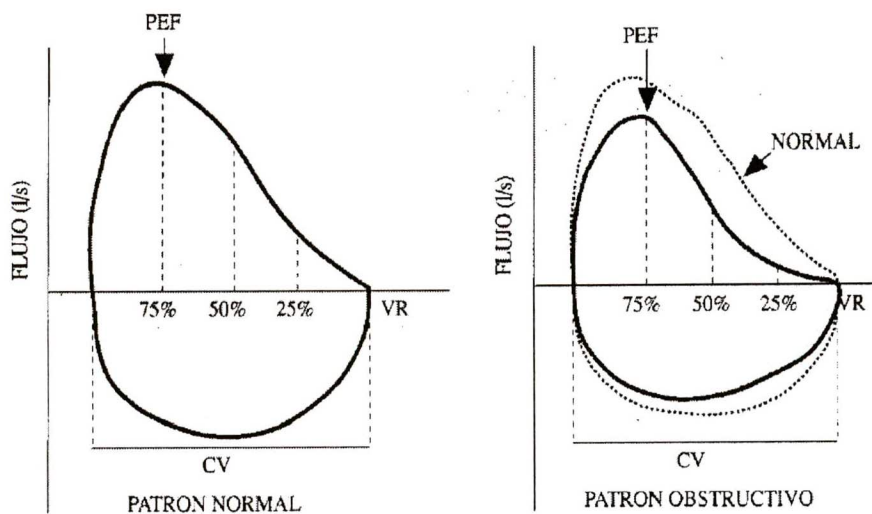


Figura 3. Espirometría forzada. Respecto al valor de referencia para su sexo y talla o a su mejor valor personal. En el asma podemos encontrarnos una *espirometría normal* o un *patrón obstructivo*, de las grandes vías aéreas (FEV1 < 80 %), de las pequeñas (FEV 25-75< 65 %) o de ambas, dependiendo de la gravedad de la enfermedad y de la fase en que se encuentra el paciente en ese momento (intercrisis, exacerbación etc.).

VALORACIÓN DE LA CRISIS ASMÁTICA

Una vez realizado el diagnóstico de asma se debe de intentar clasificar al paciente asmático con base en su gravedad para instaurar un tratamiento oportuno. Existen diferentes clasificaciones al respecto. Una de las más utilizadas es la que recomienda el Comité de expertos que conforma la “*Global initiative for Asthma*” (GINA, 2002). Dicha clasificación se basa en tres variables: síntomas, función pulmonar y respuesta al tratamiento. La presencia de al menos una de las circunstancias permite clasificar al paciente en el grupo en cuestión. Para ello siempre se valorará la más grave de las variables observadas (Tabla 1).

Tabla 1 Gravedad del asma crónica (Gina; 2002)

Clasificación	Características	Tratamiento
Leve intermitente	FEV1 \geq 80% del predicho, variabilidad <20%, no interfiere con las actividades cotidianas y es de sencillo control farmacológico	No necesario
Leve Persistente	FEV1 > 80%, en ocasiones interfiere con las actividades normales y a veces, requiere terapias más agresivas para su control	Dosis bajas de corticosteroides inhalados y mantenimiento con teofilina o modificadores de leucotrienos
Persistente Moderada	FEV1 60-80% del predicho variabilidad >30% interfiere seriamente con las actividades cotidianas e implica un continuo control	Dosis medias de corticosteroides inhalados más dosis medianas de β_2 de acción prolongada o leucotrienos
Severa Persistente	FEV1 < 60%, de síntomas frecuentes por lo que estos pacientes tienen actividades físicas limitadas y requieren de politerapia. Presenta recaídas frecuentes y los episodios ponen en peligro la vida.	Altas dosis de glucocorticosteroides combinados con sustancias relacionadas a teofilina, agonistas de acción prolongada a teofilina, agonistas de acción prolongada o modificadores de leucotrienos

COMPONENTE GENÉTICO DEL ASMA

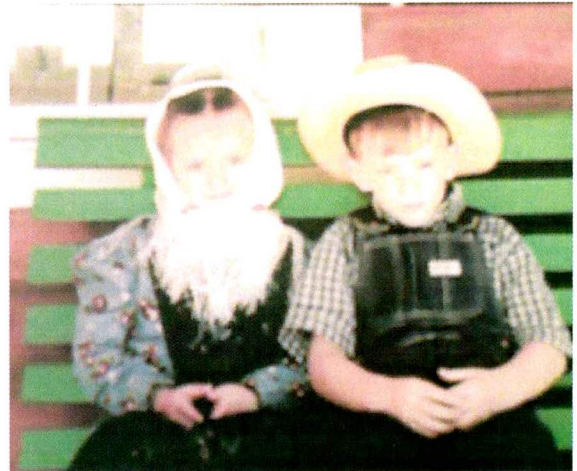
Existen evidencias que apoyan la participación de un componente genético en la etiología del asma. La primera de ellas es la agregación familiar en aquellas familias donde se presenta esta patología, el riesgo de los familiares de primer grado a desarrollar la enfermedad es 4-5 veces mayor que lo observado en la población general (20-25% Vs 4.5%) (Manian y cols, 1997) (Fig. 4). Por otra parte, estudios en gemelos han mostrado una mayor concordancia entre gemelos monocigotos que en dicigotos (19-30% Vs 5-12% respectivamente). Así el asma se presenta sólo en individuos genéticamente susceptibles que son expuestos a un medio ambiente adverso y se ha propuesto que la gran variabilidad clínica que se observa en esta entidad también es causada por una susceptibilidad genética diferencial (Los y cols; 2001).

El asma es una enfermedad compleja en cuya etiología existen interacciones entre factores genéticos y ambientales que desencadenan, aceleran o incrementan el proceso de la enfermedad. En esta situación, la enfermedad en las familias no se ajusta a los modelos de herencia mendeliana sino que seguirá un modelo de herencia denominado multifactorial (Fig. 5).

El conocimiento sobre los genes que influyen en asma y atopia se ha derivado principalmente de estudios de ligamiento y de asociación. En los estudios de ligamiento se identifican regiones cromosómicas que cosegregan con la enfermedad.



Gemelos Monocigotos



Gemelos Dicigotos

Fig. 4 Evidencias de la participación de los factores genéticos en asma. En esta enfermedad existe una mayor concordancia en gemelos monocigotos (30-70%) que en los dicigotos (5-12%) y una prevalencia de 20-25% en familiares de primer grado (4-5 veces mayor que en la población general).

La evidencia estadística de ligamiento es la medida convencionalmente conocida como el LOD score, que es el logaritmo de base 10 del cociente de dos probabilidades. Uno de los estudios de ligamiento más eficiente en las enfermedades multifactoriales es el análisis de pares de hermanos (sib-pairs), el cual consiste en que la proporción de hermanos que comparten un marcador alélico es mayor a la esperada, esencialmente si éste se encuentra ligado a la enfermedad o aledaño al gen responsable de la enfermedad. Dado que los hermanos comparten la mitad de sus genes, es de esperarse que el 50% de los de hermanos compartan el mismo alelo cuando este no se encuentre ligado al locus de la enfermedad, pero si un marcador es compartido con una frecuencia mayor al 50% esperado, podría ser una evidencia de que se encuentre ligado al locus de la enfermedad.

Los estudios de asociación investigan la coocurrencia de un marcador polimórfico con la enfermedad a nivel poblacional; en este tipo de estudio generalmente se utilizan polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Este tipo de análisis incluye los estudios de casos y controles y los basados en familias. En el primer diseño se comparan las frecuencias alélicas y genotípicas entre individuos afectados y no afectados y la asociación alélica ocurre cuando existe una mayor frecuencia del polimorfismo en los controles. En el segundo método los estudios de asociación se basan en el análisis de familiares y se investiga la frecuencia con la que un alelo dado es transmitido de padres heterocigotos a sus hijos afectados.

Los estudios de ligamiento han sido menos eficaces que los estudios de asociación para localizar genes involucrados en la etiopatogenia de las enfermedades complejas (Risch y Cols, 1996), debido a que en las enfermedades complejas no presentan un patrón de herencia mendeliano, es difícil obtener grandes pedigrees multigeneracionales por la participación de múltiples genes y a la gran interacción de los factores ambientales en su desarrollo, sin embargo actualmente la mayoría de la investigación genética de estas enfermedades se basa en la búsqueda de marcadores genéticos, principalmente SNPs (Yusuke y cols, 1998).

Un polimorfismo se define como una variación genética presente en al menos el 1% de la población en general. Los polimorfismos no son más que el resultado de variaciones en la secuencia de DNA, algunos loci polimórficos se han estudiado examinando la variación de las proteínas codificadas por sus alelos y no por las diferencias en la secuencia de DNA de los propios alelos. Existen diferentes tipos de polimorfismos:

- VNTR. Son un número variable de repeticiones en tandem. Una repetición en tandem es una secuencia corta de DNA que se repite consecutivamente. Para muchas de las repeticiones en tandem, el número de unidades repetidas varían entre los individuos, tales loci se denominan VNTRs o minisatélites (Yusuke y cols, 1998).

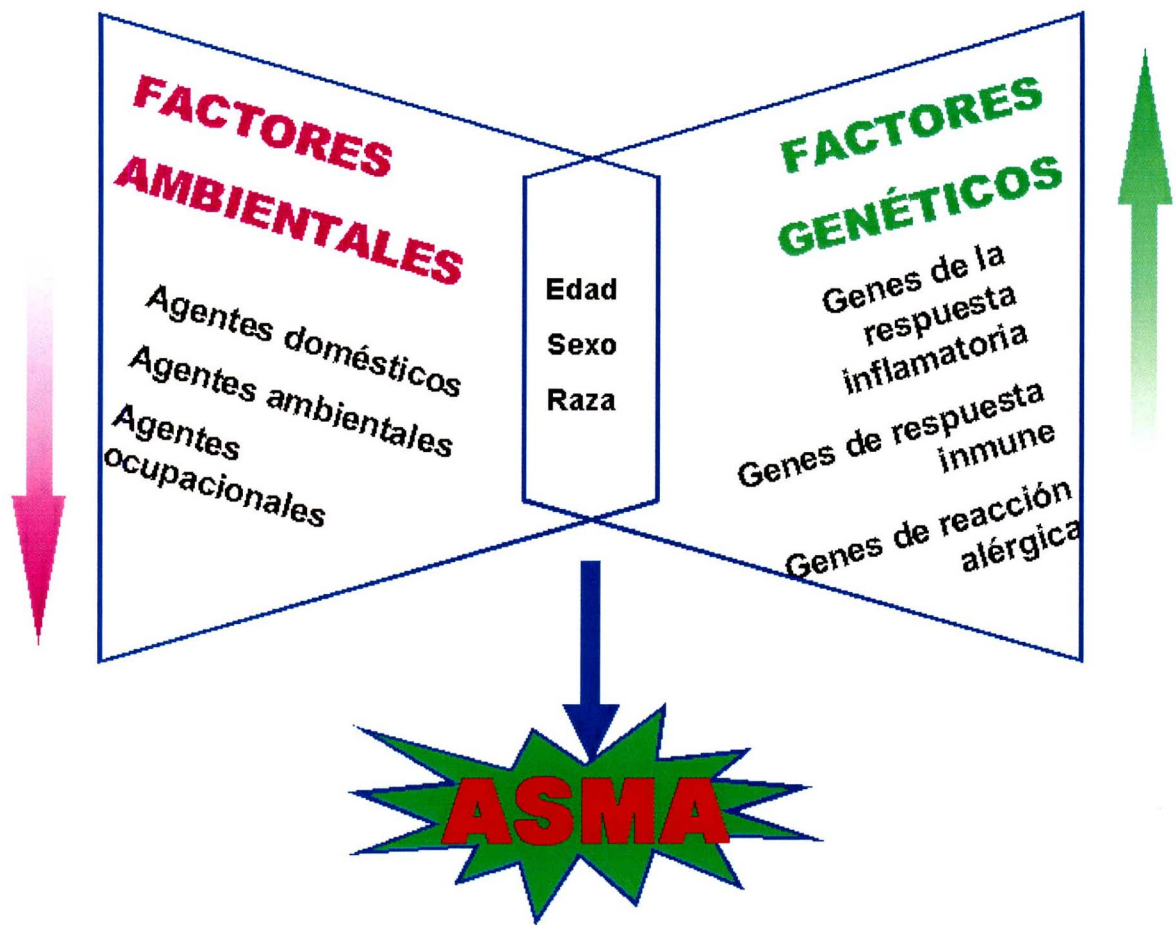


Figura 5. El asma es una enfermedad compleja, en la que se requiere la interacción, tanto de factores ambientales como genéticos para que se presente la enfermedad.

- RFLP (Fragmentos de restricción de longitud polimorfica): El tipo más tempranamente estudiado de variantes de DNA fue detectado cuando una variación o mutación puntual que ocurre en el DNA crea o elimina un sitio para una enzima de restricción. Esta variación esta presente sólo en algunos individuos, en ese caso, los fragmentos de DNA obtenidos mediante esta enzima serán de una longitud diferente entre los sujetos analizados.
- STR/SSR (microsatélites): Son secuencias cortas repetidas en tandem que se pueden encontrar en unidades de 2-6 pb y varían entre los individuos de la población. Tanto los microsatélites como los minisatélites son multialélicos, sin embargo los microsatélites son más frecuentes y polimórficos que los minisatélites, por lo que son más útiles como marcadores en los análisis de ligamiento y en la identificación de individuos para medicina forense o pruebas de paternidad.
- Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).

Los SNPs son la fuente más común de variación genética en el ser humano y se estima que en promedio existen un SNP por cada 500-800 nucleótidos (Keith; 2008). La mayoría de estos marcadores son bialélicos, muy estables, tienen una baja tasa de mutación recurrente

(Xion y cols, 1999) y es posible su genotipificación a gran escala en aparatos automatizados, por lo que tienen un alto potencial en el mapeo genético de las enfermedades complejas.

GENES CANDIDATOS

Los genes candidatos asociados al asma son de tres tipos: genes de susceptibilidad (genes que contribuyen al desarrollo de la enfermedad), genes modificadores (relacionados a la gravedad) y genes de respuesta al tratamiento (genes receptores y metabolizadores de drogas) (Fenech y cols, 2002). Dentro del grupo de genes de susceptibilidad y modificadores se incluyen a los genes que codifican para proteínas involucradas en los procesos inflamatorios, en la síntesis de IgE y en la respuesta inmune, tales como los que codifican para las citocinas IL4, IL5, IL9, IL13 y sus receptores, los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (*HLA*), del factor α de necrosis tumoral (*TNF- α*), del factor estimulante de macrófagos y granulocitos (*GM-CSF*), del factor de crecimiento de fibroblastos (*FGFA*); el gen de la metaloproteasa ADAM33, el gen de la proteína reguladora de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (*CFTR*) entre otros (MacDonald y cols, 1998). Por otra parte los genes involucrados en la respuesta al tratamiento incluyen los genes del receptor β_2 -adrenérgico (*ADR β_2*), 5-lipoxigenasa (*ALOX5*), leucotrieno sintetasa C4 (*LTCC4S*) y el gen *GCCR* (receptor de glucocorticosteroides) (Joos y cols, 2002) (Tabla 2).

El nivel de asociación de estos genes candidatos con el asma es variable, sin embargo, los genes *TNF- α* , *CFTR* y *ADRB2* son los que han mostrado resultados consistentes en diferentes poblaciones (Tabla 3). El análisis de polimorfismos en genes involucrados a la susceptibilidad y gravedad del asma, así como en genes relacionados con la respuesta al tratamiento es de gran importancia, dado que esto puede conducir a un diagnóstico más oportuno y de certeza, así como una medicina más individualizada.

Gen *TNF- α*

El gen *TNF- α* se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 6 en 6p21.3 cercano al locus *HLA-B* (región III). El gen *TNF- α* tiene un papel central como mediador de la respuesta inflamatoria y en la regulación de la respuesta inmune. Está relacionado con un rango alto de infecciones y de enfermedades inflamatorias incluyendo malaria, tifoidea, leishmania, asma, esclerosis múltiple y enfermedad de CROHN (enfermedad inflamatorias crónica del intestino). Este gen es altamente polimórfico pero sólo se han reportado dos polimorfismos localizados en su región promotora que presentan asociación con asma: -308A/G y -238G/A (Moffatt y cols, 1997) (Fig. 6).

Tabla 2. Polimorfismos en genes candidatos para la susceptibilidad del asma

Gen	Locus	SNPs	Fenotipo relacionado	Referencia
IL-4	5q31-33	-590 C-T	Aumento en IgE	Noguchi y Cols; 1998
IL-13	Xq13	-1111C/T, C1055T, Q110R	Asma, IgE	Heinzmann y Cols; 2000
ADRB2	5q31-33	Arg16Gly Gln27Glu	Asma nocturna, Resistencia a β_2 agonista, asma nocturna	Turki y Cols; 1995; Dewar et al, 1998
TNF- α	6p21	-308G/A, - 238G/A	Hiperrespuesta bronquial	Witte y Cols; 2002, Shin y Cols; 2004
HLA-II	6p21	DRB1	Específicos IgE	Ober y Cols; 1998, Wjst y Cols; 1999, Moffatt y Cols, 2001
GCCR	5q31	Asp641Va, Ile729Val	Resistencia a GCS	Liggett y Cols; 1997
ALOX5	10q11	-GGGCGG-	Resistencia a antileucotrienos	Drezen y Cols; 1999
IL-13R	Xq13	A1398G	IgE	Heinzmann y Cols; 2000
Metaloproteasa ADAM33	20p13	D1, F1, I1, L1, S1-2, T1-2, V1-7	Asma e Hiperrespuesta bronquial	Van Eerdewegh y Cols; 2002, Howard y Cols; 2003.

Tabla 3. Genes candidatos que se asocian al asma en diferentes poblaciones

Gen	Loci	SNPs y mutación	Fenotipo relacionado	Población
ADRB2	5q31-33	Arg 16 → Gly Gln 27 → Glu	Asma nocturna, asma dependiente de esteroides	Adultos mexicanos, caucásicos, asiáticos y alemanes
TNF- α	6p21	-308 -238	Susceptibilidad a asma	Caucásicos, australianos e islandeses
CFTR	Δ F508	7Q31-33	Asma	Griegos y franceses

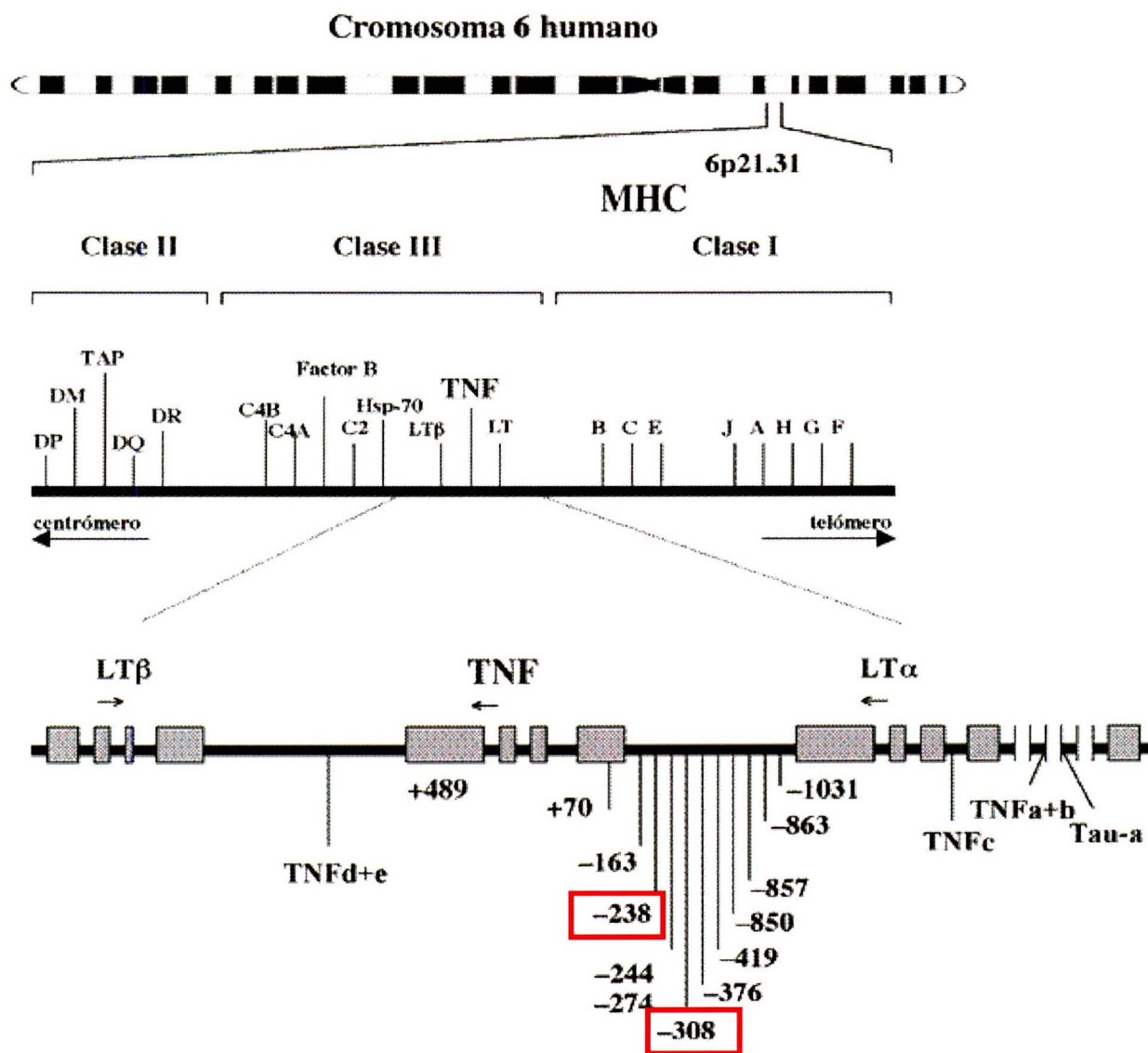


Figura 6. Gen *TNF-α*. Se localiza en cromosoma 6p21.3 cercano al locus HLA-B (región III), es muy polimórfico pero en especial 2 polimorfismos localizados en la región promotora se han reportado con mayor asociación a asma (marcados con recuadros) (Ackerman; 2003).

Gen del receptor β_2 adrenérgico (*ADRB2*)

La mayor parte de los estudios han mostrado que la asociación entre los polimorfismos de gen *ADRB2* y la susceptibilidad al asma es muy débil o no existe (Dewar y cols, 1998). No obstante, se ha observado una asociación importante con la respuesta al tratamiento y con la gravedad de la enfermedad (gen modificador). En este gen se han reportado nueve polimorfismos diferentes, de los cuales 4 resultan en cambios no sinónimos en sustituciones de aminoácidos en las posiciones 16 (Arg16Gly), 27 (Gln27Glu), 34 (Val34Met) y 164 (Thr164Ile), siendo el SNP 16 (Gly16Arg) el más común (Fig. 7). Con excepción del polimorfismo 34, estos alteran la función del receptor (Liggett y cols, 1997), sin embargo no existen diferencias significativas entre las frecuencias de estos polimorfismos en sujetos asmáticos y en controles sanos. Los pacientes con el polimorfismo Gly16 presentan síntomas nocturnos con mayor frecuencia, parecen tener una hiperreactividad de las vías respiratorias a histamina (Turki y cols, 1995; Dewar y cols, 1998) y muestran una pobre respuesta a la terapia con β_2 agonistas requiriendo el uso de corticoesteroides y/o inmunoterapia (Reihnsaus y cols, 1993; Liggett y cols, 1997).

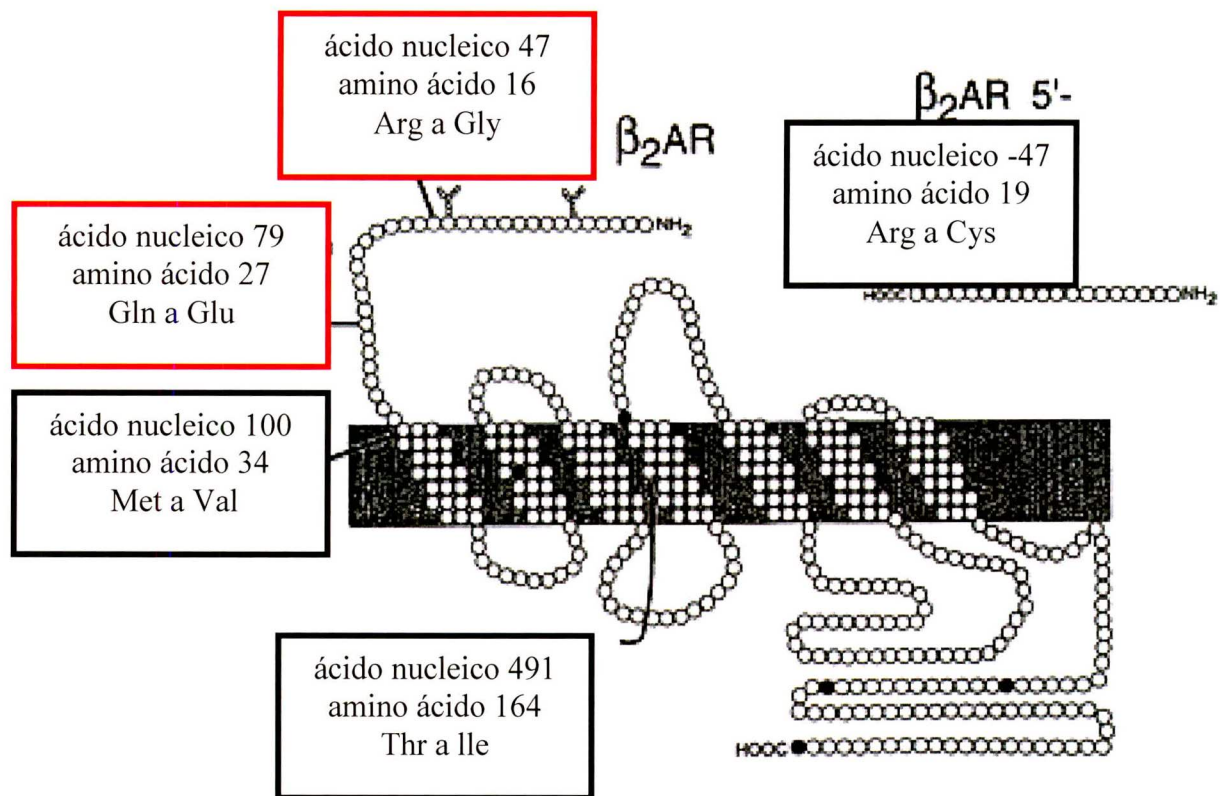


Figura 7. Proteína del receptor β_2 -Adrenérgico. El gen *ADRB2* tiene 9 polimorfismos de los cuales 3 están asociados al asma. El cambio de una arginina por una glicina en la posición 16 de la proteína y un glutamato por un ácido glutámico en la posición 27 son los cambios más comúnmente asociados con asma (Stephen y cols, 2000).

Gen *CFTR*

El gen regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (*CFTR*), se localiza en la región q31 del cromosoma 7, mide 250 kb y consta de 27 exones (Fig. 8). La región 5' de este gen se caracteriza por un gran contenido de G-C (aproximadamente un 65%) y no presenta caja TATA, de tal manera que el gen *CFTR* tienen un promotor similar al de los genes constitutivos, sin embargo su expresión es variable.

El transcrito maduro es de 6.5 Kb y se traduce en una proteína de 1,480 aminoácidos detectable en una gran variedad de tejidos, especialmente en pulmón páncreas, glándulas sudoríparas, hígado, mucosa nasal, glándulas salivales, tracto reproductivo e intestino.

En estudios realizados en diferentes poblaciones encontraron una alta frecuencia de mutaciones *CFTR* en pacientes asmáticos, lo que sugiere que éste confiere susceptibilidad a desarrollar asma (Schwartz y cols, 2003; Girodon y cols, 1997, Schibler y cols, 2001). De hecho se ha observado que la mutación $\Delta F508$ en estado heterocigoto está asociada a una disminución en la función pulmonar y la susceptibilidad al asma (Dahl y cols, 1998).

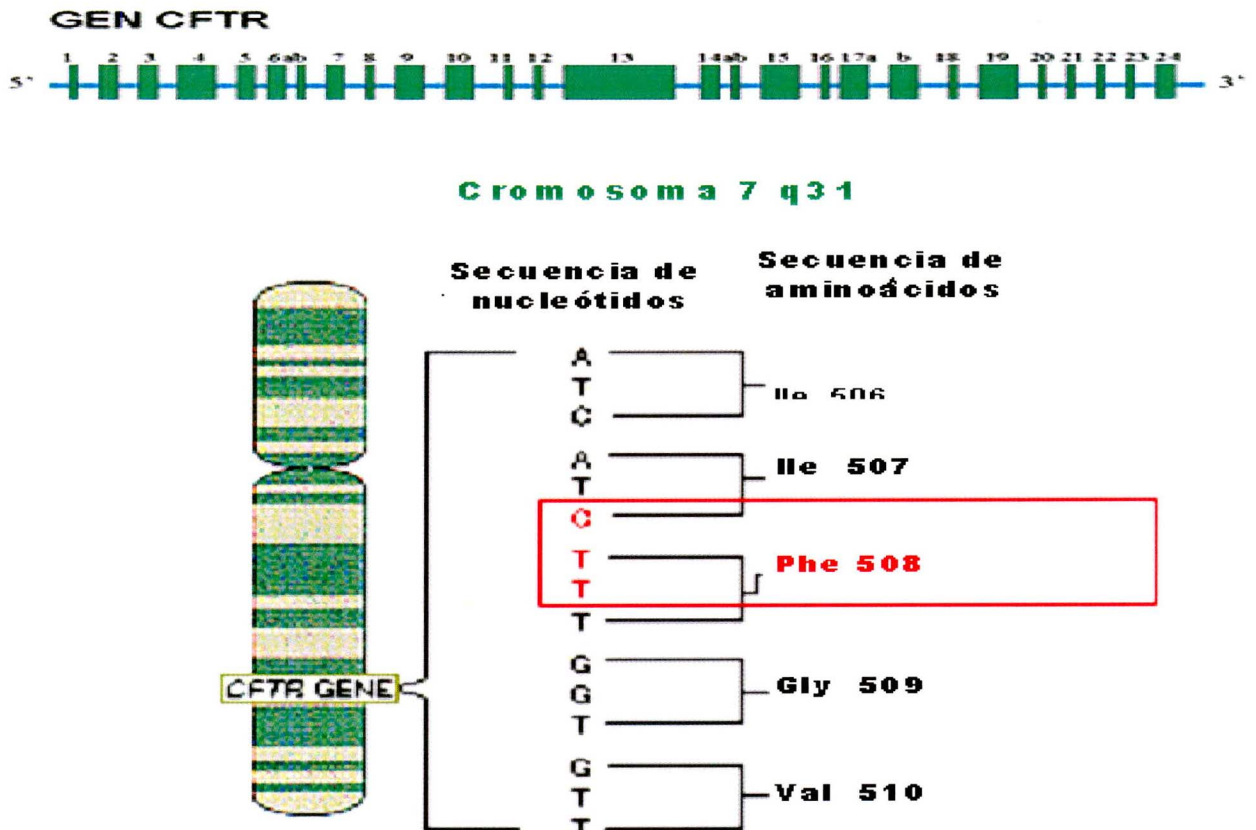


Figura 8. Localización del gen *CFTR* en el cromosoma 7q31. Contiene 27 exones. En el exón 10 se localiza la deleción de una fenilalanina en la posición 508, mutación llamada $\Delta F508$.

JUSTIFICACIÓN

El asma es la enfermedad crónica más común en la infancia, cuyo costo socio-económico hace de ella un problema de salud pública. La prevalencia de esta entidad se ha incrementado sustancialmente en las últimas décadas, actualmente afecta a 300 millones de individuos en el mundo. En México se calcula que existen 10 millones de asmáticos y ésta es la segunda causa de hospitalización en niños. Por otra parte, algunos reportes indican que la mortalidad del asma también se ha incrementado.

Existen fuertes evidencias de que la susceptibilidad genética, así como el número de alelos afectados y la importancia relativa de los factores genéticos pueden variar entre los diferentes grupos étnicos y que estas diferencias, junto con el medio ambiente, pueden ser las determinantes en las variaciones de la gravedad, prevalencia de la enfermedad y la diversidad en la respuesta al tratamiento que se ha observado entre las poblaciones (CSGA, 2002); así, es imprescindible identificar los genes asociados al asma en cada población. Por otra parte, parece ser que en el asma del niño el componente genético es mayor que en el asma del adulto; por lo tanto la población pediátrica representa la muestra ideal para el estudio de los factores genéticos implicados en esta enfermedad.

Sin duda, el conocimiento de los factores genéticos involucrados en la etiopatogénesis del asma es la mejor vía para incrementar el conocimiento de su patogénesis y mejorar las estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento, encaminadas a disminuir el alto costo social y económico del asma.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si variantes localizadas en genes candidatos se encuentran asociados con asma infantil en población mexicana.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si polimorfismos localizados en los genes *TNF- α* y *ADRB* se encuentran asociados a la susceptibilidad del asma en una muestra de pacientes mexicanos
2. Conocer si existe correlación entre los polimorfismos identificados en los genes *TNF- α* y *ADRB2* con la gravedad de la enfermedad.
3. Determinar si la mutación $\Delta F508$ del gen *CFTR* participa en la etiología del asma.

HIPÓTESIS

La mutación $\Delta F508$ del gen *CFTR* y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en genes *TNF- α* y *ADRB2* se encuentran asociados a la susceptibilidad y gravedad en niños mexicanos con asma.

DEFINICIONES OPERACIONALES

- I. **Diagnóstico:** El diagnóstico y clasificación del asma, se estableció como sigue, de acuerdo con los criterios del NIH (National Institutes of Health, USA): dos o más episodios de sibilancias y disnea en el último año; reversión de las sibilancias y disnea en forma espontánea o con tratamiento broncodilatador, disminución de la función pulmonar, hospitalización por crisis asmáticas en los últimos seis meses.
- II. **Clasificación:** La gravedad de los pacientes fue determinada por un neumólogo y un alergólogo de acuerdo a los criterios de clasificación establecidos por el programa GINA (Global Initiative for Asthma) y/o BTS (British Toracic Society) y fueron clasificados como se muestra en la Tabla 1.

Asma persistente media: Síntomas más de una vez a la semana, pero menos de una vez al día. Exacerbaciones que pueden afectar la actividad y el sueño. Asma nocturna más de dos veces al mes. FEV1 \geq 80%, PEF \geq 80%, variabilidad de PEF o FEV1 de 20-30%.

Asma persistente moderada: Síntomas diarios. Exacerbaciones que afectan el sueño y la actividad. Asma nocturna más de una vez por semana. FEV1 60-80%, variación de PEF menor a 30%. Tratamiento con inhalación de glucocorticosteroides (200-1000 μ g BDP o su equivalente) más β_2 agonistas.

Asma persistente severa: Síntomas continuos. Exacerbaciones frecuentes. Asma nocturna frecuente. FEV1 menor a 60%, variación de PEF mayor a 30%. Tratamiento con inhalación de glucocorticosteroides ($\leq 500\mu\text{g}$ BDP o su equivalente) y β_2 agonistas de acción prolongada, más administración oral de modificadores de leucotrienos, teofilinas, glucocorticosteroides y/o β_2 agonistas de acción prolongada.

III. Diagnóstico funcional: El diagnóstico funcional fue determinado mediante espirometría, al observar una disminución de FEV1 menor al 80% del predicho y al observar reversibilidad de por lo menos el 12% del valor basal después de la administración de un β_2 agonista.

IV. Atopia: Se diagnosticaron por elevación de la concentración de IgE en suero total o por pruebas cutáneas a alérgenos comunes.

MATERIAL Y METODOS

CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Casos y controles, observacional, transversal, prospectivo y descriptivo

POBLACIÓN DE ESTUDIO

En este estudio se incluyeron 90 pacientes con diagnóstico de asma, sus padres y/o sus hermanos. Cada paciente fue evaluado por un médico alergólogo, un neumólogo y un genetista, quienes llenaron la hoja de captación de datos en donde se incluyen datos demográficos del paciente, diagnóstico y evolución de la enfermedad, así como los antecedentes heredo familiares (ver Anexo). Como controles se incluyeron 250 individuos sanos captados en la ciudad de México y pareados por sexo.

Criterios de inclusión

Pacientes pediátricos mexicanos mayores de 5 años con diagnóstico clínico y funcional de asma.

Hermanos afectados con asma, padres de los pacientes asmáticos o hermanos sanos.

Para el grupo control, se incluyeron individuos sanos sin antecedentes de asma o alergia (determinado mediante la aplicación de un cuestionario). Dado que

el genoma no cambia con la edad, se seleccionaron como controles individuos mayores de 18 años para asegurar que no hayan desarrollado asma o alergia durante la infancia.

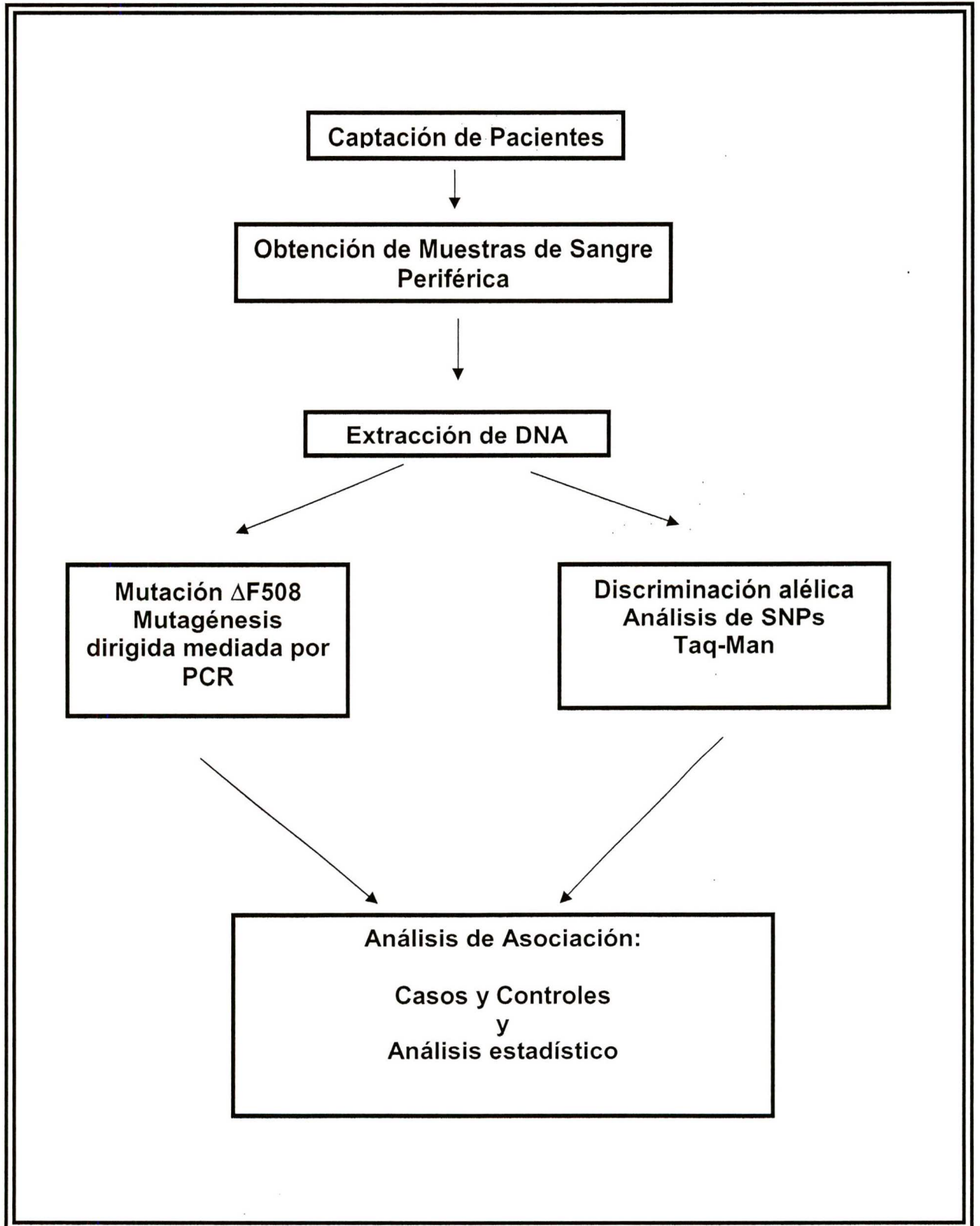
Se incluyeron en el estudio sólo aquellos casos que además de cumplir con los criterios de inclusión, aceptaron firmar la carta de consentimiento informado (ver Anexo).

Criterios de exclusión

Se excluyeron a todos aquellos casos con diagnóstico de cualquier otra enfermedad crónica concomitante (fibrosis quística, tuberculosis, etc.)

Temporalmente fueron excluidos a los pacientes y a sus padres transfundidos en los tres meses anteriores diagnóstico.

ESTRATEGIA GENERAL



Obtención de muestras

Se obtuvieron 5-10 ml de sangre periférica de cada muestra, usando EDTA como anticoagulante.

Extracción de DNA de sangre periférica

La extracción del DNA genómico se realizó mediante la técnica de fenol/cloroformo o con un kit de purificación Gentra. La concentración e integridad del DNA fueron valoradas por espectrofotometría y en geles de agarosa (ver anexo).

Técnica Fenol/Cloroformo

Lisis celular

1. Se centrifugó la muestra de sangre total (periférica) a 2500-3000 rpm durante 20 min.
2. Una vez centrifugada la muestra se extrajo cuidadosamente la capa de leucocitos formada en la interfase del plasma y los glóbulos rojos. Esto se realiza con una pipeta Pasteur y en una tubo limpio y seco.

3. Al tubo con los leucocitos, se le agregaron de 8-10 ml de RCLB (Red Cell Lysis Buffer), tratando de que se llene tres cuartas partes del volumen del tubo.
4. Se agitó vigorosamente la muestra en un Vortex cerca de 2 minutos.
5. Se centrifugó a 2500-3000 rpm x 10 min.
6. Se eliminó el sobrenadante, se agregó el mismo volumen de RCLB y se agitó vigorosamente en Vortex hasta resuspender totalmente el sedimento.
7. Al sedimento obtenido se le adicionaron 125 μ l de RCLB y se realizó un nuevo lavado centrifugando 2500-3000 rpm x 10 min.
8. Se agregaron 600 μ l de WCLB (White Cell Lysis Buffer) y se agitó vigorosamente en vortex hasta resuspender totalmente el sedimento.
9. Se incubó la muestra a 42°C por 18 a 20 horas.

Extracción fenólica

1. Después de incubar la muestra por 18-20 hrs se le adicionó un volumen equivalente de fenol equilibrado (amortiguado)
2. Se agitó la muestra vigorosamente de 1-2 minutos en un Vortex
3. Se agitó la muestra por inversión o en un agitador mecánico, por 10 min
4. Enseguida se centrifugó la muestra a 2500-3000 rpm x 10 min.
5. Se extrajo la fase superior acuosa y se depositó en un tubo limpio y seco.
6. Se agregó un volumen de solución fenol/cloroformo equivalente.

7. Se agitó por inversión o en un agitador mecánico, por 10 min.
8. La muestra se centrifugó a 2500-3000 rpm x 10 min.
9. Con una pipeta se retiró la fase superior acuosa y se depositó en un tubo limpio y seco.
10. Cuando fue necesario se repitió la extracción fenol/cloroformo
11. Se agregó un volumen equivalente a la muestra, de solución cloroformo/alcoholisoalílico (24:1)
12. Se agitó por inversión o en un agitador mecánico, por 10 min.
13. Se centrifugó la muestra a 2500-3000 rpm x 10 min.
14. Se colocó la capa superior a un tubo limpio y seco
15. Se agregaron 85 μ l de NaCl 1M y un pequeño volumen de etanol absoluto frío.
16. Se agitó por inversión hasta que el DNA se condensó y precipitó.
17. Se retiró el DNA con ayuda de una pipeta de punta en gancho, realizando movimiento giratorios en torno a las hebras formadas
18. La muestra se dejó secar a temperatura ambiente.

Lavado del DNA

1. En un tubo limpio se colocó aproximadamente un 1 ml de etanol al 70% y se enjuagó el DNA por inmersión, introduciendo y retirando la punta de la pipeta varias veces y con mucho cuidado.
2. El DNA se dejó secar a temperatura ambiente.

3. En un tubo de Ependorf, rotulado, que contiene TE (Tris EDTA), se resuspendió el DNA con movimientos suaves para desprenderlo de la pipeta. Tapar cuidadosamente el tubo.
4. El DNA contenido en esta solución se mantuvo a -20°C , o bien a 4°C (una alícuata).

Extracción rápida de DNA.

Kit de purificación Gentra

1. Se centrifugó la muestra de sangre total (periférica) a 2500-3000 rpm durante 20 min.
2. Una vez centrifugada la muestra se extrajo cuidadosamente la capa de leucocitos formada en la interfase del plasma y los glóbulos rojos. Esto se realizó con una pipeta Pasteur y en un tubo limpio y seco.
3. Al tubo con los leucocitos, se le agregaron de 8-10 ml de RCLB (Red Cell Lysis Buffer) tratando de llenar tres cuartas partes del volumen del tubo.
4. Se agitó vigorosamente la muestra en un Vortex cerca de 2 min.
5. Se centrifugó 2500-3000 rpm durante 10 min
6. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron el mismo volumen de RCLB y se realizó un nuevo lavado centrifugando a 2500-3000 rpm durante 10 min. Se realizaron los lavados necesarios.

7. Al sedimento obtenido se le adicionaron 500 μ l de RCLB y se agitó vigorosamente en vortex hasta resuspendio totalmente.
8. Se agregaron 3 ml de WCLB (White Cell Lysis Buffer) y se agitaron vigorosamente en vortex.
9. Se agregó un 1 ml de precipitador de proteínas y se agitó el tubo x 20 seg.
10. Se centrifugó la muestra a 3500 rpm durante 5 min.
11. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y seco, por decantación directa del tubo.

Precipitación de DNA

12. Se agregó isopropanol al 100% en proporción 1:2 o 1:1 al volumen de sobrenadante obtenido en el paso anterior.
13. Se agitó suavemente por inversión hasta observar las fibras de DNA. Se debe tener precaución de no agitar vigorosamente para no compactar las fibras de DNA.
14. El DNA se retiró con ayuda de una pipeta de punta en gancho, realizando movimientos giratorios en torno a las hebras formadas.
15. El DNA obtenido se dejó secar al aire y a temperatura ambiente.

Lavado del DNA

16. En un tubo limpio se colocó cerca de 1 ml de etanol al 70% y se enjuagó el DNA por inmersión, introduciendo y retirando la punta de la pipeta varias veces y con mucho cuidado.
17. Enseguida se seco al aire y a temperatura ambiente
18. En un tubo de ependorf rotulado, que contenía 100µl de solución hidratante, se le agregó el DNA obtenido y se mantuvo a 4°C.

ANÁLISIS MOLECULAR

Análisis de la mutación $\Delta F508$.

El análisis molecular de la mutación $\Delta F508$ en el gen *CFTR* se realizó mediante mutagénesis dirigida mediada por PCR (PSM).

Mutagénesis dirigida mediada por PCR (PSM)

Detección de la mutación $\Delta F508$

La técnica PSM se utilizó para detectar la mutación $\Delta F508$. Para llevar a cabo esta metodología se sintetizaron un par de oligonucleótidos o primers; el "forward" (F) 3'GCACCATTAAAGAAAATATGAT y el reverse (R) 5'ACCATTAAGAAAATATGAT, que flanquean el sitio en donde se localiza la mutación antes mencionada (Friedman,1990). El oligonucleótido F fue diseñado con un cambio en una base que genera una mutación puntual que crea un sitio de

restricción para la enzima específica *Mbol* en el alelo normal pero no en el mutado lo que permite discriminar ambos alelos (Tabla 4). El programa para obtener el producto de amplificación se realizó con 35 ciclos (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C) y las condiciones descritas en la Tabla 5.

Digestión enzimática

En este análisis, el producto de PCR que se obtiene es de 219 pares de bases (pb). Los alelos sin la mutación $\Delta F508$ son digeridos por la enzima *Mbol*, generando dos fragmentos, uno de 202 pb y otro de 17 pb, sin embargo los alelos con la mutación $\Delta F508$ no son cortados. Así los individuos normales (N/N) o pacientes con asma sin esta mutación en ninguno de sus alelos, muestran las bandas de 202 y 17 pb; los pacientes homocigotos ($\Delta F508/\Delta F508$) presentan la banda de 219 pb; mientras que los pacientes heterocigotos para la mutación $\Delta F508$ ($\Delta F508/N$), tienen las bandas de 219, 202 y 17 pb y un heterodúplex producto del rearreglo entre las cadenas de alelos normales y mutantes durante la PCR. Para la digestión enzimática se utilizó una alícuata de 20 μ l del producto de amplificación, se incubó con 2.5 μ l de buffer 10X correspondiente a la enzima de restricción *Mbo1* con 1 μ l (10 U/ μ l, Promega) (Tabla 5).

Después de la digestión de los amplificados, los fragmentos se analizaron en geles de acrilamida al 9.2% (ver anexo) y así, se logró distinguir los alelos mutados de los normales.

Esta mutación se buscó en todos los casos índice y en los familiares de primer grado de los pacientes para detectar a los portadores.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la detección de la mutación $\Delta F-508$ mediante PSM.

Mutación	Primer 5'.....3'	Enzima	Pb	Fragmentos generados
$\Delta F-508$	F:GCACCATTAAAGAAAATAT <u>G</u> AT R:CATTACAGTAGCTTACCCA	Mbol	219 pb	202 + 17 pb

Tabla 5. Condiciones de la PCR para la detección de la mutación $\Delta F-508$.

Buffer {10X}	2.5 μ l
MgCl {25 mM}	3 μ l
DNTPs {10 mM}	1 μ l
Primer F {200ng/ μ l}	1 μ l
Primer R {200ng/ μ l}	1 μ l
Taq {1 U}	0.4
H ₂ O	14.2 μ l
DNA 100 ng/ μ l	2 μ l

Electroforesis de DNA

Geles de agarosa

Se siguieron los métodos descritos por Maniatis y col. (1982) y Sambrook y col. (1989). Se utilizó agarosa (Boehringer Mannheim) en concentraciones del 1 y 3% para analizar la integridad y los productos de PCR respectivamente. La concentración de agarosa utilizada dependió del rango del tamaño de los fragmentos.

Geles de Acrilamida

Se utilizó acrilamida al 30%. Se requieren 29g de acrilamida más 1 g de bisacrilamina.

Preparación de los geles de acrilamida

Acrilamida/Bis 29:1 (30%): se utilizaron 3 ml de TBE 5X, 7.2 ml de H₂O, 150 de persulfato de amonio al 10% y 15 µl de TEMED.

B. Genotipificación de SNPs en genes candidatos

El análisis de los SNPs en los genes *TNF- α* y *ADRB2* fueron analizados mediante el método fluorescente de 5' exonucleasa (TaqMan®)(Fig. 12).

Método fluorescente de 5' exonucleasa

La caracterización de SNPs fue mediante la técnica de TaqMan®. En este ensayo de discriminación alélica se diseñaron 2 sondas específicas marcadas en el extremo 5' con fluorocromos diferentes, FAM para el alelo 1 y VIC para el alelo 2, además ambas sondas tienen en el extremo 3' un "quencher" (TAMRA), el cual mientras la sonda permanece intacta, inhibe la emisión de fluorescencia. Durante la reacción de PCR los primers hibridan con una secuencia específica del templado de DNA. Si éste contiene la secuencia polimórfica, la sonda de TaqMan también híbrida con su secuencia homóloga. Durante la PCR, la AmpliTaq Gold, que tiene actividad tanto de DNA 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 utilizada durante la reacción, sólo la sonda específica para el polimorfismo presente será capaz de hibridar. Por lo tanto es posible diferenciar un alelo del otro con base en el tipo de fluorescencia emitida. (Holland y cols, 1991).

Análisis Estadístico

Para determinar si las diferencia observadas en la frecuencia de los SNPs entre casos y controles se realizó la prueba de chi-cuadrada, utilizando los programas estadísticos SPSS y NCSS.

RESULTADOS

ANÁLISIS DE LA MUTACIÓN $\Delta F508$

En los 90 casos se logró amplificar el exón 10 del gen *CFTR* (Fig. 10). El análisis de la mutación $\Delta F508$ mostró ausencia de la mutación en los pacientes con asma, ya que todos ellos mostraron la banda de 202 pb, producto de la digestión con la enzima *Mbol*. Se incluyeron como controles pacientes con FQ heterocigotos y homocigotos para esta mutación y todos ellos fueron positivos. (Fig 11).

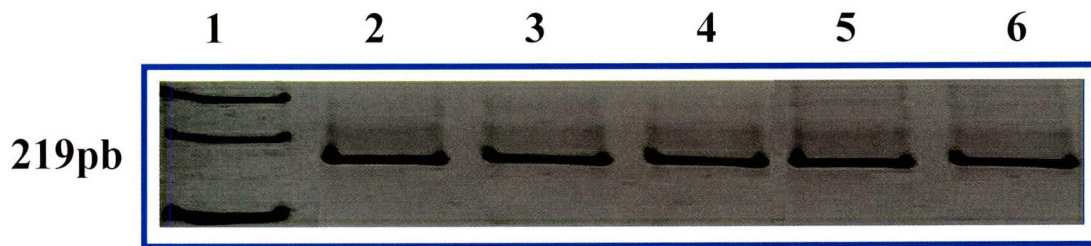


Figura 10. Amplificación del exón 10 del gen *CFTR*. Gel de agarosa al 3%, donde se muestra la amplificación de todas las muestras. Carril 1: marcador de peso molecular (100pb); carriles 2 y 5: pacientes con asma; carriles 3, 4 y 6: pacientes con la mutación $\Delta F508$ diagnosticados con FQ.

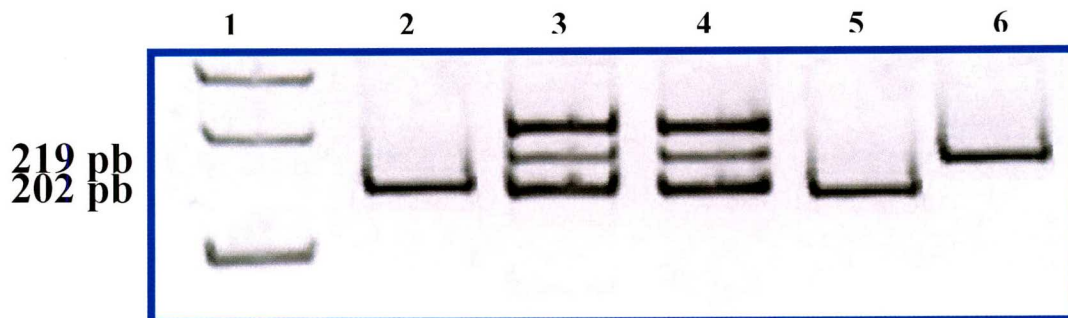


Figura 11. Análisis de la mutación $\Delta F508$. Gel de acrilamina al 15%. Carril 1: marcador de MPM; carriles 2 y 5: pacientes asmáticos; carriles 3 y 4: pacientes con FQ heterocigotos para la mutación $\Delta F508$ y carril 6: paciente con FQ homocigoto con la mutación $\Delta F508$.

DISCRIMINACIÓN ALÉLICA

Se realizó la discriminación alélica mediante el método de fluorescencia 5'esonucleasa (TaqMan), de polimorfismos localizados en los genes *ADRB2* y *TNF α* (Fig. 12).

Análisis de los polimorfismos en el gen β_2 adrenérgico

Se incluyeron para esta parte 90 pacientes asmáticos y 250 controles sanos.

El análisis molecular de los SNPs Arg16Gly, el cual conduce al cambio de una arginina por una glicina y del SNP Gln27Glu que causa el cambio de un ácido glutámico por una glutamina en el gen *ADRB₂* mostró la siguiente distribución: las frecuencias de los genotipos Arg16Arg, Arg16Gly y Gly16Gly en los casos fueron de 13, 57 y 30% respectivamente, mientras que en los controles fueron de 15, 52, y 33%, sin embargo cuando se aplicó la prueba estadística χ^2 obtuvimos un valor de 0.48, con una $P_{0.05}$ de 0.78, por lo tanto no hay una diferencia significativa entre estas frecuencias genotípicas (Tabla 6). Con respecto a la frecuencias alélicas para los alelos A y G del polimorfismo Arg16Gly se observan frecuencias idénticas entre casos y controles (41% (A) y 59% (G)) (χ^2 de 0.024 y una $P_{0.05}$ 0.87 (Tabla 7).

En relación a los datos obtenidos con el SNPs Glu27Gln las frecuencias de los genotipos Gln27Gln, Gln27Glu, Glu27Glu en los casos y controles fueron de 75, 23 y 2% Vs 77, 22 y 1% respectivamente, con una χ^2 de 1.01 y una $P_{0.05}$ 0.60, (Tabla 8). Las frecuencias alélicas se encontraron en un 87% para el alelo C y un

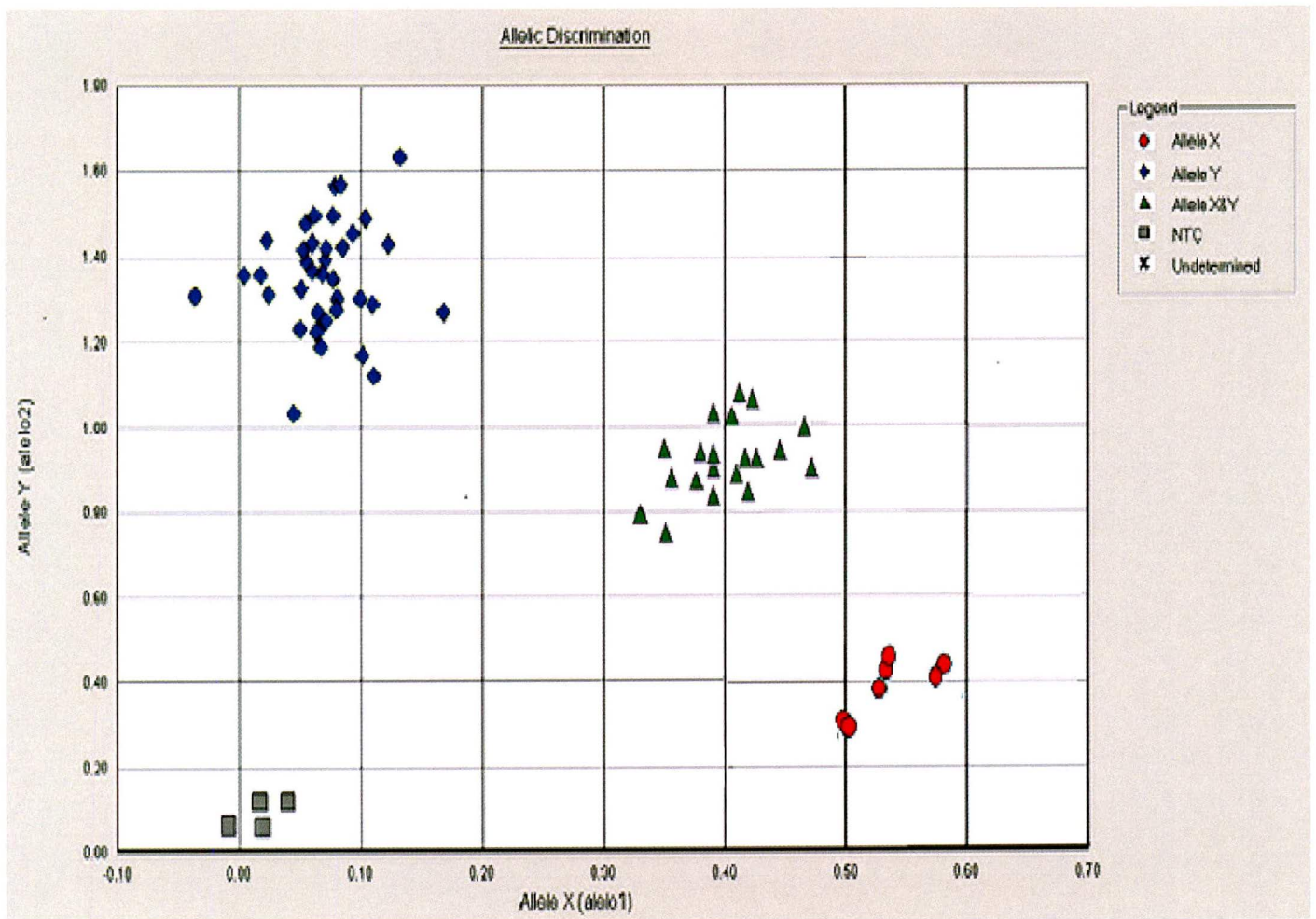


Figura 12. Discriminación Alélica de *ADRB2* (Gln27Glu) mediante el método de TaqMan. Se muestra en azul los homocigotos (CC), en verde los heterocigotos (CG) y en rojo los homocigotos (GG).

22% para el alelo G en los casos, mientras que en controles se observó un porcentaje de 88 y 12% respectivamente (χ^2 de 0.9 y una $P_{0.05}$ de 0.3) (Tabla 9). En ningún caso se observaron diferencias significativas, el análisis de genotipos en el gen *ADRB2* permitió identificar 8 diplotipos diferentes tales como: AA/GG, AA/CC, AG/GG, AG/CG, AG/CC, GG/GG, GG/CG y GG/CC. Cuando se comparó la distribución de los diplotipos entre casos y controles se observó que AA/GG se encontró sólo en uno de los controles (0.04%), mientras que el AG/GG se encontró sólo en los casos (1%, $P_{0.05}$ 0.09); el diplotipo AA/CC se observó con una frecuencia idéntica (14%) entre casos (n=12) y controles (n=35), así mismo se observaron frecuencias similares entre casos y controles con los diplotipos GG/CC (11%) y AG/CC (41% vs 42%). Otros genotipos fueron el AG/CG con frecuencias de 14% en los casos y el 11% en los controles ($P_{0.05}$ de 0.29), el GG/GG con 1% en casos y 0.6% en controles y el GG/CC con una distribución del 18% en casos y 21% en controles. En ninguno de los casos se observaron diferencias significativas (Tabla 10).

Tabla 6. Frecuencias genotípicas del polimorfismo Arg16Gly del gen *ADRB2* en una muestra de pacientes mexicanos con asma.

POLIMORFISMO	GENOTIPO	CASOS n(%)	CONTROLES n(%)	χ^2	P _{0.05}
Arg16Gly	AA	12 (13)	37 (15)	0.48	0.78
	AG	51 (57)	131 (52)		
	GG	27 (30)	82 (33)		
Total		90	250		

Tabla 7. Frecuencias alélicas del polimorfismo Arg16Gly del gen *ADRB2* en pacientes mexicanos con diagnóstico de asma.

POLIMORFISMO	ALELO	CASOS n(%)	CONTROLES n(%)	χ^2	P_{0.05}
Arg16Gly	A	75 (41)	205 (41)	0.024	0.87
	G	105 (59)	295 (59)		
Total		180	500		

Tabla 8. Frecuencias genotípicas del polimorfismo Gln27Glu localizado en el gen *ADRB2* en pacientes mexicanos diagnosticados con asma.

POLIMORFISMO	GENOTIPO	CASOS n(%)	CONTROLES n(%)	χ^2	P _{0.05}
Gln27Glu	CC	65 (75)	192 (77)	1.01	0.60
	CG	23 (23)	55 (22)		
	GG	2 (2)	3 (1)		
Total		90	250		

Tabla 9. Frecuencias alélicas del polimorfismo Gln27Glu localizado en el gen *ADRB2* en pacientes mexicanos diagnosticados con asma.

POLIMORFISMO	ALELO	CASOS n(%)	CONTROLES n(%)	χ^2	P_{0.05}
Gln27Glu	C	153 (87)	439 (88)	0.9	0.3
	G	27 (22)	61 (12)		
Total		180	500		

Tabla 10. Distribución de genotipos en el gen *ADRB2* en pacientes mexicanos con diagnóstico de asma.

GENOTIPOS <i>ADRB16/ADRB27</i>	CASOS n(%)	CONTROLES n(%)	P_{0.05}
AA/GG	0 (0)	1 (0.4)	0.54
AA/CC	12 (14)	35 (14)	0.88
AG/GG	1 (1)	0 (0)	0.09
AG/CG	13 (14)	26 (11)	0.29
AG/CC	37 (41)	106 (42)	0.85
GG/GG	1 (1)	2 (0.6)	0.78
GG/CG	10 (11)	27 (11)	0.92
GG/CC	16 (18)	53 (21)	0.49
TOTAL	90	250	

ANÁLISIS DE CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Los pacientes se clasificaron de acuerdo con la gravedad de la enfermedad. De un total de 90 pacientes asmáticos, 34 fueron diagnosticados con fenotipos intermitente leve, 25 con persistente leve, 29 con persistente moderada y 2 con persistente severa (Tabla 11).

El análisis de la correlación entre los polimorfismos en el gen *ADRB2* y la gravedad de la enfermedad no mostró diferencias estadísticamente significativas para el diplotipo AA/CC; la frecuencia de este diplotipo en pacientes con fenotipo intermitente leve fue del 12%, en persistente leve del 20% y en persistente moderada 7% con una $P_{0.05} 0.34$. El genotipo AG/GG se encontró sólo en el grupo en pacientes con asma intermitente leve con una frecuencia del 3%. El diplotipo AG/CG se encontró en el 17% de los pacientes clasificados como intermitente leve, en el 12% de los pacientes clasificados como persistente leve y en el 13% de los pacientes clasificados como persistente moderada. El diplotipo AG/CC se encontró en el 47% en los casos con fenotipo intermitente leve, en el 40% de los pacientes con el fenotipo persistente leve y en el 38% de los pacientes con fenotipo persistente moderada. El diplotipo GG/GG sólo se observó en un paciente con fenotipo persistente leve (4%); El diplotipo GG/CG se observó en el 6% de los pacientes con fenotipo intermitente leve y en el 28% de los casos con asma persistente moderada; el diplotipo GG/CC se observó en el 15% de los pacientes con asma intermitente leve, en el 24% con persistente leve, en el 14% con persistente moderada y en uno de los 2 casos con asma persistente severa.

Tabla 11. Polimorfismos en el gen *ADRB2* y la gravedad del asma en pacientes mexicanos

Genotipos <i>ADRB16/ADRB27</i>	Intermitente leve n (%)	Persistente leve n (%)	Persistente Moderada n (%)	Persistente Severa n	P _{0.05}
AA/CC	4 (12)	5 (20)	2 (7)	1	0.34
AG/GG	1 (3)	0	0	0	0.44
AG/CG	6 (17)	3 (12)	4 (13)	0	0.81
AG/CC	16 (47)	10 (40)	11 (38)	0	0.74
GG/GG	0	1 (4)	0	0	0.27
GG/CG	2 (6)	0	8 (28)	0	0.002
GG/CC	5 (15)	6 (24)	4 (14)	1	0.54
TOTAL	34	25	29	2	

Análisis de haplotipos

El análisis de haplotipos del gen *ADRB2* mostró la presencia de 3 combinaciones: Gly16/Gln27, Arg16/Gln27, Gly16/Gly27. La primera combinación mostró un OR de 0.98 (95% CI 0.68-1.42), la segunda mostró un OR de 0.96 (95% CI 0.66-1.39) y la tercera del 1.04 (95% CI 0.58-1.86). En ninguna de ellas se encontraron diferencias significativas.

Tabla 12. Frecuencia de haplotipos en el gen *ADRB2* en pacientes con diagnóstico de asma.

<i>ADRB2</i>	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	χ^2	$P_{0.05}$	OR (95% CI)
G/C	76 (47)	243 (48)	0.001	0.97	0.98 [0.68-1.42]
A/C	66 (41)	204 (40)	0.04	0.83	0.96 [0.66-1.39]
G/G	19 (12)	62 (12)	0.001	0.97	1.04 [0.58-1.86]
TOTAL	161	509			

Análisis de los polimorfismos del gen *TNF- α*

Polimorfismo -238 G/A

La frecuencia del genotipo GG fue de 91% en los casos y del 89% en los controles; el heterocigoto GA se encontró en el 8% de los casos y en el 10% en los controles, mientras que la frecuencia de los homocigotos para el alelo A fue del 1% tanto en casos como en controles. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P_{0.05}$ de 0.79) (Tabla 13). El análisis de la frecuencias alélicas mostró que el 95% en los casos y el 94% de los controles presentaron el alelo G, mientras que para el alelo A se observó una frecuencia del 5% en los casos y un 6% en los controles, no obteniendo una diferencia significativa (χ^2 0.16 y $P_{0.05}$ de 0.68) (Tabla 14).

Polimorfismo -308 G/A

La frecuencia del genotipo GG fue de 86% en los casos y del 91% en los controles; el heterocigoto GA se encontró en el 13.5% de los casos y en el 9% de los controles, mientras que no se observaron homocigotos para el alelo A tanto en

casos como en controles. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P_{0.05}$ de 2.07) (Tabla 15). El análisis de las

Tabla 13. Frecuencias genotípicas del polimorfismo -238 localizado en la región promotora del gen *TNF- α* .

POLIMORFISMO	GENOTIPO	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	χ^2	$P_{0.05}$
<i>TNF-α</i> -238	GG	82 (91)	223 (89)	0.44	0.79
	GA	7 (8)	25 (10)		
	AA	1 (1)	2 (1)		
Total		90	250		

Tabla 14. Frecuencias alélicas del polimorfismo -238 localizado en la región promotora del gen *TNF- α* .

POLIMORFISMO	ALELO	CASOS n(%)	CONTROLES n(%)	χ^2	P _{0.05}
TNF- α -238	G	171 (95)	471 (94)	0.16	0.68
	A	9 (5)	29 (6)		
Total		180	500		

Tabla 15. Frecuencias genotípicas del polimorfismo -308 localizado en la región promotora del gen *TNF- α*

POLIMORFISMO	GENOTIPO	CASOS n(%)	CONTROLES n(%)	χ^2	P _{0.05}
TNF- α -308	GG	78 (86.5)	226 (91)	2.07	0.15
	GA	12 (13.5)	20 (9)		
	AA	0	0		
Total(n)		90	250		

frecuencias alélicas mostró que el 93% en los casos y el 94% de los controles presentaron el alelo G, mientras que para el alelo A se observó una frecuencia del 7% en los casos y del 6% en los controles, no obteniendo una diferencia significativa (χ^2 1.34 y $P_{0.05}$ de 0.24) (Tabla 16).

Tabla 16. Frecuencia alélica del polimorfismo -308 localizado en la región promotora del gen *TNF- α*

POLIMORFISMO	ALELO	CASOS n(%)	CONTROLES n(%)	χ^2	$P_{0.05}$
TNF- α -308	G	168 (93)	472 (94)	1.34	0.24
	A	12 (7)	22 (6)		
Total		180	500		

El análisis de diplotipos en el gen *TNF- α*

Con los polimorfismos mencionados se encontraron 7 diferentes diplotipos en el gen *TNF- α* tales como: GG/GG, GA/GG, GA/GA, GA/AA, AA/GG, AA/GA y AA/AA. El diplotipo GG/GG se encontró con una frecuencia del 1% en los casos y 0.4% en los controles ($P_{0.05}$ 0.78), el GA/GG se observó con una frecuencia del 8% tanto en los casos como en controles ($P_{0.05}$ 0.94), el GA/GA se encontró ausente en los casos y presente en el 0.4% de los controles ($P_{0.05}$ 0.396), el GA/AA se encontró sólo en el 1% en los controles ($P_{0.05}$ 0.29), el AA/GG se documentó con una frecuencia del 78% de los casos y 84% de los controles ($P_{0.05}$ 0.47), el genotipo AA/GA estuvo presente en el 13% de los casos y en el 6% de los controles ($P_{0.05}$ de 0.039), el AA/AA no se observó en ninguno de los casos y en los controles sólo se encontraron 4 casos (1%) ($P_{0.05}$ 0.22). Estos resultados mostraron diferencia significativas solo para el diplotipo AA/GA encontrándose con una mayor frecuencia en los casos que en los controles (Tabla 17).

Análisis de correlación genotipo-fenotipo

El total de pacientes con asma intermitente leve fueron 34 casos, con persistente leve 25, con persistente moderada 29 y con persistente severa 2, dando un total de 90 casos estudiados (Tabla 18).

En la correlación de los diplotipos y la gravedad de la enfermedad se observó que el genotipo GG/GG sólo se encontró en pacientes con asma

persistente moderada ($P_{0.05}$ 0.54), para el diplotipo GA/GG se documentó una frecuencia del 3% en el grupo con fenotipo intermitente leve, del 4% en persistente leve y del 8% en persistente moderada; este diplotipo también se observó en uno de los pacientes con fenotipo persistente severo ($P_{0.05}$ 0.76); AA/GG se encontró en el 70% de los pacientes clasificados como intermitente leve, en el 92% de los pacientes con persistente leve, en el 74% de pacientes con persistente moderada y en uno de los pacientes con persistente severa ($P_{0.05}$ 0.13); el genotipo AA/GA se encontró en el 22% de los pacientes con asma intermitente leve, en el 4% de los pacientes con fenotipo persistente leve y en el 14% de los pacientes con asma persistente moderada ($P_{0.05}$ 0.18) (Tabla 18).

Se encontraron en nuestra población 3 haplotipos en el gen *TNF- α* : G238/G-308, A-238/G-308 y G-238/A-308, cuya frecuencia no mostró diferencias significativas entre casos y controles.

Tabla 17. Distribución de genotipos en el gen *TNF- α* .

Genotipos -238/308 GA/GA	Casos n(%)	Controles n (%)	P_{0.05}
GG/GG	1 (1)	2 (0.4)	0.78
GA/GG	7 (8)	19 (8)	0.94
GA/GA	0	2 (0.4)	0.396
GA/AA	0	3 (1)	0.29
AA/GG	71 (78)	204 (84)	0.47
AA/GA	12 (13)	16 (6)	0.039
AA/AA	0	4 (1)	0.22
Total	90	250	

Tabla 18. Polimorfismos en el gen *TNF- α* y la gravedad de la enfermedad.

Genotipos <i>TNF-α</i>	Intermitente leve n(%)	Persistente leve n(%)	Persistente Moderada n(%)	Persistente Severa n(%)	P_{0.05}
GG/GG	0	0	1 (3)	0	0.7
GA/GG	3 (8)	1 (4)	2 (8)	1	0.13
AA/GG	24 (70)	23 (92)	22 (74)	1	0.1
AA/GA	7 (22)	1 (4)	4 (14)	0	0.29
TOTAL	34	25	29	2	

Tabla 19. Frecuencia de haplotipos en el gen *TNF- α*

<i>TNF-α</i>	CASOS n(%)	CONTROLES n(%)	χ^2	$P_{0.05}$	OR (95% CI)
G/G	159 (88)	454 (89)	0.27	0.6033	0.83 [0.47-1.49]
A/G	12 (7)	21 (5)	1.26	0.26	0.66 [0.31-1.43]
G/A	8 (5)	25 (6)	0.067	0.79	1.1 [0.47-2.69]
TOTAL	180	500			

DISCUSIÓN

El asma es un padecimiento cuya frecuencia ha aumentado en los últimos años en forma considerable en los niños, se calcula que entre el 10 y el 15% de la población general padece la enfermedad. Diversos estudios han puesto en evidencia la fuerte correlación entre los factores ambientales y los genéticos con el desarrollo y gravedad del asma, así como con la respuesta al tratamiento. Uno de los genes que se han asociado al origen del asma es el gen *CFTR*, el cual es el responsable de la fibrosis quística (FQ). En poblaciones francesa, griega, israelita y danesa se ha documentado que individuos heterocigotos para la mutación $\Delta F508$ tienen una mayor susceptibilidad para desarrollar asma. De hecho en la población israelita la mutación $\Delta F508$ se ha identificado en aproximadamente el 2% de los padres diagnosticados como asmáticos y cuyos hijos padecen FQ (Mussaffi y cols, 2000).

En 1998 Morten y Cols (Morten y cols, 1998) estudiaron 250 pacientes diagnosticados con asma y observaron que el 9% era portador de la mutación, posteriormente los mismos autores (Morten y cols, 2001) reportaron otro estudio con un mayor número de individuos (n=605) diagnosticados con asma severa donde encontraron que el 38% tenía la mutación mencionada en estado heterocigoto. Por otra parte, en Francia se ha reportado una frecuencia de 2.9%

de dicha mutación en pacientes diagnosticados con asma (Guilloud-Bataille y cols, 2000).

En nuestro estudio, donde se incluyeron 90 pacientes, no se encontró la mutación $\Delta F508$. Nuestros resultados sugieren que la mutación $\Delta F508$ no participa en el desarrollo del asma en la población mexicana, sin embargo no podemos descartar la posibilidad de su participación, incluso de otras mutaciones en el gen *CFTR* con son G542X, $\Delta I507$, N1303K, S549N, entre otras, ya que el tamaño de la muestra es muy pequeño, por lo que el estudio no alcanzó un poder estadístico adecuado para que nuestros resultados sean contundentes. Es importante señalar que el gen *CFRT* está asociado al incremento de la función pulmonar en individuos asmáticos con obstrucción en las vías aéreas y es importante mencionar que este gen está jugando una papel importante en la hiperactividad bronquial.

En algunas poblaciones el estudio de los polimorfismos (SNPs) Arg16Gly, Gln27Glu, en el gen *ADRB2* y $TNF\alpha$ -238 y $TNF\alpha$ 308 en el gen *TNF- α* han revelado que estos se encuentran asociados al asma (gravedad: *ADRB2*, susceptibilidad: *TNF- α*) (Rehisaus y cols, 1993; Uday y cols, 2001, Matthias y cols, 2000). Así mismo, se ha observado que el efecto de cada uno de estos polimorfismos en la susceptibilidad del asma es diferente entre las poblaciones y aún dentro de una misma población (Matthias y cols, 2000).

En este trabajo nosotros analizamos los polimorfismos Arg16Gly, Gln27Glu, $TNF\alpha$ -308 y $TNF\alpha$ -238 en individuos asmáticos y en un grupo de individuos sanos.

El análisis de la frecuencia del polimorfismo Arg16Gly en el gen *ADRB2*, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los casos y los controles.

Estos resultados están de acuerdo con algunos autores donde, ellos reportan una falta de asociación entre este polimorfismo y asma, aunque ellos observaron que existe una disminución de la expresión del receptor B2 adrenérgico (Green y Cols; 1995, Matthias y cols; 2000, Wang y Cols; 2001).

El análisis del polimorfismo Gln27Glu mostró que el estado homocigoto (Glu27Glu) se presenta con una frecuencia relativamente baja en nuestra población (casos: 2% vs controles: 1%) mientras que en población alemana y asiática es más frecuente, incluso a diferencia de lo observado en nuestra población, en Alemania y Asia la frecuencia de este alelo es mayor en pacientes asmáticos (Gree y cols, 1994; Martinez y cols, 1995; Matthias y cols, 2001).

Al analizar la distribución de los genotipos en nuestra población de estudio observamos que el diplotipo Arg16Glu/Gly27Gly no mostró diferencias significativas entre casos y controles, sin embargo este genotipo fue frecuente en la población mexicana, similar a lo reportado en otros estudios como en la población caucásica (Matthias y cols, 2002; Martinez y cols, 1995).

Interesantemente al analizar la asociación del genotipo con la gravedad de la enfermedad, observamos que el diplotipo Gly16Gly/Gln27Gln es significativamente más frecuente en individuos que presentan asma persistente moderada, lo que sugiere el gen *ADRB2* es un gen modificador que se asocia con la gravedad del asma en población mexicana. Otro de los genotipos que se asociaron con la gravedad de la enfermedad en la población mexicana fue el genotipo Gly16Gly/Glu27Glu, ya que éste se encontró con mayor frecuencia en individuos con asma persistente leve. Lo anterior sugiere que en asma podría ser posible encontrar genotipos marcadores de cada clasificación, lo cual contribuiría a mejorar las estrategias de diagnóstico y tratamiento.

Otro de los genes analizados fue el gen *TNF α* , el cuál es una molécula proinflamatoria con efectos biológicos relevantes en la inflamación y en la remodelación de las vías aéreas al activar a los eosinófilos, liberando metaloproteasas implicadas en este proceso (Uday y cols, 2001).

Al analizar el polimorfismo -238 localizado en la región promotora del gen *TNF α* se observó que las frecuencias de los alelos y genotipos son muy similares tanto en casos como en controles, resultados similares a los realizados en la población caucásica (Doo y cols, 2003).

Al analizar la frecuencia del polimorfismo -308 en nuestra población observamos que tanto los casos como los controles tienen una frecuencia similar,

a diferencia de lo reportado previamente en la población caucásica, donde dicho polimorfismo en estado heterocigoto participa en la etiología del asma (Louis y cols, 2000 y Buckova y cols, 2002). Por otra parte al analizar la distribución de los diplotipos observamos que el genotipo AA/GG tiene una alta frecuencia en nuestra población (78% vs 84), genotipo que podría ser característico de la población mexicana, sin embargo no observamos una diferencia estadísticamente significativa entre casos y controles.

En contraste, el genotipo AA/GA mostró diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles, sugiriendo que este genotipo podría tener un papel en la susceptibilidad del asma en población mexicana. Estos resultados apoyan lo observado en otras poblaciones como la Coreana (Soo-Jong y Cols; 2007), la caucásica de EU y la indú (Shilpy y cols; 2006).

El genotipo GG/GA no se observó en nuestra población, mientras que en población Japonesa es uno de los más frecuentes (Migita y cols, 2005).

Al analizar la relación de los genotipos con la gravedad de la enfermedad no observamos ninguna diferencia estadísticamente significativa, similar a lo observado en otras poblaciones como la Coreana (Chang y cols, 2005).

Al analizar la frecuencia de los haplotipos derivados de los polimorfismos –238 y –308 localizados en dicho gen se observaron las siguientes combinaciones: G/G, A/G, G/A, sin embargo no se observaron diferencias significativas entre casos y controles.

En resumen, los resultados de esta tesis sugieren que el gen *ADRB2* es un gen modificador, mientras que el gen *TNF α* es un gen de susceptibilidad para el desarrollo del asma, aunque también parece ser que se encuentra involucrado en la gravedad de la enfermedad. Por otra parte, estos resultados apoyan la aseveración de que existen variaciones interpopulacionales, por lo que es necesario el análisis de los genotipos relacionados con enfermedades como el asma en cada población.

CONCLUSIONES

El análisis de las frecuencias de los alelos y de los genotipos del gen *ADRB2*, sugiere que este gen no participa en la susceptibilidad para desarrollar asma en la población mexicana.

La asociación del genotipo GG/CG del gen *ADRB2* con la gravedad del asma observada en este trabajo, apoyan la hipótesis de que polimorfismos en este gen podrían modificar la gravedad del asma.

El análisis de la frecuencia genotípica del polimorfismo -308 del gen *TNF- α* , sugiere que este gen tiene un papel importante en la susceptibilidad para padecer asma y apoya los resultados observados en otras poblaciones.

El análisis de los polimorfismos del gen *TNF- α* muestra una distribución de los genotipos de acuerdo con la gravedad de la enfermedad, por lo que análisis similares podrían contribuir en un futuro para la clasificación y el manejo de los pacientes con asma.

Existe una gran heterogeneidad en la frecuencia y distribución de los polimorfismos en los genes analizados en comparación con otras poblaciones.

Es necesario incrementar el tamaño de la muestra.

REFERENCIAS

1. Burrows B, Martinez FD, Halonen M. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1989; 320:271.
2. Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R, et al. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;3:507-11.
3. Carrington M, Miller T, White M, Gerrard B, Stewart C, Dean M, Mann D. Typing of HLA-DQA1 and DQB1 using single-strand conformation polymorphism. *Hum Immunol* 1992; 33:208-12.
4. 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.
5. Cobos Barroso N, Asma: del síntoma al remodelamiento. *An Pediatr* 2003; 58(Supl 1): 89-96.
6. Collins A, Morton NE. Tests and estimates of allelic association in complex inheritance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1741-1745
7. Daniels SE, Bhattacharyya S, James A, Leaves NI, Young A, Hill MR, Faux JA, Ryan GF, Lathrop GM, Musk AW, Cookson WO. A genome-wide search for quantitative trait loci underpinning asthma. *Nature* 1996; 383: 247-250
8. Dewar JC, Weathley AP, Venn A, Morrison JFJ, Britton J, Hall IP. β_2 -adrenoreceptor polymorphisms are in linkage disequilibrium but are not

- associated with asthma in an adult population. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 442-448.
9. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. GINA. National Institutes of Health. National Heart, Lung and Blood Institute. Revised 2002. www.ginasthma.com
 10. Elias JA, Lee cG, Zheng T, Ma B, Homer RJ, Zhu Z. New insights into the pathogenesis of asthma. *J Clin Invest* 2003; 111: 291-297.
 11. Friedman KJ. Highsmith WE. Prior TW. Perry TR. Silverman LM. Cystic fibrosis deletion mutation detected by PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chem* 1990;36:695-696.
 12. Girodon E, Cazeneuve C, Lebagry F, Chinet T, Costes B, Ghanem N, Martin J, Lemay S, Scheid P, Housser B, Bignon J, Goossens M. *CFTR* gene mutations in adults with disseminated bronchiectasis. *Eur. J Hum Genet* 1997; 5(3); 149-55
 13. Giovanni M. and Pier F. Pignatti. A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. *J Appl Genet* 2005; 46(1); 93-104.
 14. GSGA (The Collaborative Study on the Genetics of Asthma). A genome-wide search for asthma susceptibility in ethnically diverse populations. *Nat Genet* 2004; 15:389-392.
 15. Hiruyuki T. Functional Molecules in Allergic Bronchial Asthma. *Pharm Soc Jap* 2002; 637-642.
 16. Holgate ST. Genetic and environmental interaction in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;1139-1146.

BIBLIOTECA UACM

17. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerases. *Proc Nat Acad Sci* 1991; 88:7276-80.
18. Hopp RJ, Townley RG, Biven RE The presence of airway reactivity before the development of asthma. *Am Rev Respir* 1990; 141:2-8.
19. international Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431:931-945
20. Joos L, Sandford A. Genotype predictors of response to asthma medications. *Curr Opin Pulm Med* 2002; 8: 9-15
21. Liggett SB. Polymorphisms of the β_2 -adrenergic receptor and asthma. *Am J Resp Crit Care Med* 1997; 156: S156-S162
22. Laitinen LA, Heino M, Laitinen A, Kava T, Haahtela T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1985;131:599-606.
23. Li X, Wilson JW. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am J Respir Crit Care med* 1997;156:229-33
24. Los H. Postmus PE. & Boomsma DI. Asthma genetics and intermediate phenotypes: a review from twin studies. *Twin Res* 2001; 4:81-93.
25. Manian P. Genetics of asthma: A review. *Chest* 1997; 112: 1397-1408
26. Maniatis T, Sambrook J. Molecular cloning a laboratory manual VII 2a. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989; USA pp 7.87

27. MacDonald SM, Jameson J. Allergic Diseases: Asthma as a Model: From Principles of Molecular Medicine 1998.
28. Moffatt MF, Cookson WOCM. Linkage and candidate gene studies in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: S110-S112
29. Minshall EM, Hogg JC, Hamid QA. Cytokine mRNA expression in asthma is not restricted to the large airways. *J Allergy Immunol* 1998; 103: 476-483.
30. Nakamura Y, Tate L, Ertl RF, Kawanoto M, Mio T, Adachi Y. Bronchial epithelial cell regulate fibroblast proliferation. *Am J Physiol* 1995;269:L377-87.
31. National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel Report II: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. National Institutes of Health Pub 2000: 97-112.
32. Ober C, Cox NJ, Abney M, Di Rienzo A, Lander ES, Changyaleket B, Gidley H, Kurtz B, Lee J, Nance M, Pettersson A, Prescott J, Richardson A, Schlenker E, Summerhill E, Willadsen S, Parry R. 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- 1398
33. Prasad Manian. Genetics of Asthma: A Review. *Impact of basic research on tomorrow's medicine*. 2001; 112:1397-1408.
34. Protocolo Diagnóstico y Terapéutico del Asma Infantil. Comité del Asma de la Sociedad Española de Inmunología Clínica y Alergología Pediátrica. *Allergol Immuno pathol* 2000; 1 :13-20.

35. Reihaus E, Innis M, MacIntyre N, Liggett SB. Mutations in the gene encoding for the β_2 -adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 334-339
36. Rico-Mendez FG, Barquera X, Cabrera DA, Escobedo S, Ochoa LG, Massey-Reynaud LF. Bronchial asthma healthcare costs in Mexican Institute of Social Security. *Invest Allergol Clin Inmunol* 2000; 6:334-41.
37. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996; 273:1516-17.
38. Cobos, Escribano, Garcia, Gonzalez, Liñán, Oliva, Pérez, Sirvent, Canalejo. Síndrome de Obstrucción Bronquial en la Infancia. Grupo del Trabajo para el Estudio de la Enfermedad Asmática en el Niño. *An Esp Pediatr* 2002;56 (Supl7): 37-43.
39. Schibler, Bolt I, Gallati S, Schöni MH, Kraemer R. High morbidity and mortality in cystic fibrosis patients compound heterozygous for deltaF508. *Eur Respir J* 2001; 17(6):1181-6.
40. Smith DH, Malone DC, Lawson KA, Okamoto LJ, Battista C, Saunders WB. A national estimate of the economic costs of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 787-793.
41. Smith EJ, Shi L, Smith G. Expressed sequence tags for the chicken genome from a normalized 10-day-old white leghorn whole-embryo cDNA library. DNA Sequence Analysis of Genetic Variation in Commercial Chicken Populations. *Genome* 2002; 45(2): 261-267.

42. Spielman RS, Ewens WJ. The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet* 1996; 59:983-89.
43. Turki J, Pak J, Green SA, Martin LJ, Liggett SB. Genetic polymorphisms of the β_2 -adrenergic receptor in nocturnal and non-nocturnal asthma. *J Clin Invest* 1995; 95: 135-1641
44. 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; 64:629-640.
45. Von mutius, Illi S. House-dust mite allergen exposure and the development of asthma in children. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2003; 90(1):6-7.
46. Weller M. Development, significance and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol* 1997;233-45.
47. Weller PF. The immunobiology of eosinophils. *N Engl J Med* 1991;324:1110-8.
48. Wjst M, Fischer G, Immervoll T, Jung M, Saar K, Rueschendorf F, Reis A, Ulbrecht M, Gomolka M, Wess E, H, Jaeger L, Nickel R, Richter K, Kjellman NI, Griese M, Von berg A, gappa M, Riedel F, Boehle M, van Koningsbruggen s, Schoberth P, Szczepanski R, Dorsch w, Silbernann M, Wichmann HE. A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group. *Genomics* 1999; 58(1): 1-8.

49. Zetterquist H, Olerup O. Identification of the HLA-DRB1*04,-DRB1*07, and -DRB1*09 alleles by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Hum Immunol* 1992; 34:64-74.
50. Guilloud-Bataille M, De Crozes D, Rault G, Degioanni A, Feingold J. The clinical centers of the CF French registry : Cystic fibrosis mutations report from the French registry. *Hum Hered* 2000; 50:142-145.
51. Shilpy Sharma, Amit Sharma, Sarvesh Kumar, Surendra K. Sharma, and Balaram Ghosh. Association of *TNF* Haplotypes with Asthma, Serum IgE Levels, and Correlation with Serum *TNF α* levels. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35: 488-495.
52. Randolph AG, Lange C, Silverman EK, Lazarus R, and Weiss ST. Extended haplotype in the tumor necrosis factor gene cluster is associated with asthma and asthma-related phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172 (6): 687-692.
53. Chang H, Kim J, Lee J, Cho J, Rhim T, Uh S, Park B, Chung I, Park C and Shin H. A single nucleotide polymorphism on the promoter of eotaxin 1 associates with its mRNA expression and asthma phenotypes. *J Immunol* 2005; 174(3): 1525-1531.
54. Migita O, Noguchi E, Koga M, Jian Z, Shibasaki M, Migita T, Ito S, Ichikawa K, Matsui A, Arinami T. Haplotype analysis of a 100 kb region spanning *TNF-LTA* identifies a polymorphism in the *LTA* promoter region that is associated with atopic asthma susceptibility in Japan. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35(6):790-796.

55. Keith JM, McRae A, Duffy, Mengersen K, Visscher PM. Calculation of IBD probabilities with dense SNP or sequence data. *Genet Epidemiol.* 2008; 9999 (9999).
56. Ackerman H, Stanley U, Mott R, Richardson A, Sisay-Joof fatoumatta, Katundu P, Taylor T, Ward R, Molyneux M, Pinder M y Kwiatkowski D. Haplotypic analysis of the TNF locus by association efficiency and entropy. *Genome Biol.* 2003; 4 (4):R24.
57. Sambrook j, Fritsch ef, Maniatis t. *Molecular cloning : A laboratory Manual* (Cold Spring Harberr Lab,Cold Spring Harbor , NY).1989.