



VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

TESIS DOCTORAL

DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA, GINECOLOGÍA  
Y PEDIATRÍA

**Análisis molecular del gen *TPSAB1*,  
un gen polimórfico**

Laura Hernández Hernández

2013

DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA, GINECOLOGÍA Y PEDIATRÍA



**VNiVERSIDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

TESIS DOCTORAL

**Análisis molecular del gen *TPSAB1*,  
un gen polimórfico.**

Laura Hernández Hernández

DIRECTORES

Dr. D. Félix Lorente Toledano

Dra. Dña. María Isidoro García

Dr. D. Ignacio J. Dávila González

---

2013





# VNiVERSIDAD D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA, GINECOLOGÍA Y PEDIATRÍA

## **Análisis molecular del gen *TPSAB1*, un gen polimórfico.**

Memoria presentada por Dña. Laura Hernández Hernández para optar al grado de

Doctora

Fdo: Laura Hernández Hernández

2013

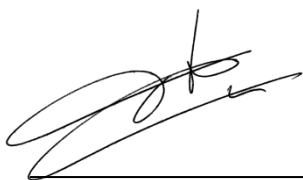


El Profesor Dr. D. Félix Lorente Toledano, Catedrático del Departamento de Obstetricia, Ginecología y Pediatría, la Profesora Dra. Dña. María Isidoro García, Profesora Asociada de Medicina Molecular del Departamento de Medicina y el Profesor Dr. D. Ignacio J. Dávila González, Profesor Asociado de Alergología del Departamento de Obstetricia, Ginecología y Pediatría

**CERTIFICAN:**

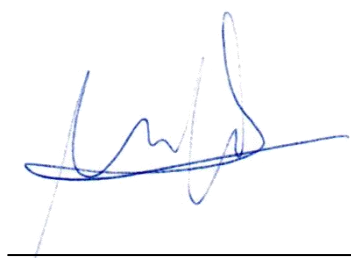
Que el trabajo titulado “*Análisis molecular del gen TPSAB1, un gen polimórfico*”, que presenta la licenciada en Biología Dña. Laura Hernández Hernández ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Obstetricia, Ginecología y Pediatría y reúne, a nuestro juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el Tribunal correspondiente y optar al grado de Doctora por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Salamanca a 22 de Abril de 2013.



---

Fdo: Dr. Félix Lorente Toledano



---

Fdo: Dra. María Isidoro García



---

Fdo: Dr. Ignacio J. Dávila González



*A mi familia  
A mis amigos  
por ser incondicionales en mis días*





*Queda prohibido no sonreír a los problemas,  
no luchar por lo que quieres,  
abandonarlo todo por miedo,  
no convertir en realidad tus sueños.*

*Pablo Neruda*



## *Agradecimientos*

*Me incluyo entre las personas con fortuna, como una vez dijo un poeta. Ahora que cuatro años de trabajo cobran forma y se plasman en papel muchas personas tienen cabida en estas líneas por lo que han supuesto a lo largo de este tiempo.*

*El Dr. Félix Lorente, la Dra. María Isidoro y el Dr. Ignacio Dávila, directores de este trabajo, no sólo han confiado en el resultado del mismo si no que me han permitido aprender a su lado, evolucionando en lo profesional y creciendo en lo personal.*

*Mis compañeros del Laboratorio de Alergia; Catí y Choní que siempre tienen un hueco para prestar ayuda, para aprender de ellas; Virginia con sus consejos, Elena e Iñaki por las muchas tardes compartidas, David y Marién, con los que di mis primeros pasos en el laboratorio, Carmen que nos cuida con tanto cariño y Eva que me trata con el cariño que lo haría una hermana, todos ellos, las “resis” y todo el Servicio de Alergia hacen de esta una pequeña familia con la que es un placer trabajar.*

*Mis amigos, después de tantos años, “nadie sabe que fue aquello y por eso conocemos el secreto de estar juntos, a pesar de tanto tiempo”, siempre han estado ahí, sin saber muy bien que hacía pero apoyándome al fin y al cabo. Miriam, Gonza, Pinto, Machu, Ana, Raquel, Pablo, Sofía, Pacho, Marta, David, Modino; todos, cada uno a su manera siguen demostrando que los logros de cada uno son pequeños logros para los demás.*

*Mi familia; mis abuelos, mis tíos y primos, todos y cada uno, han hecho que me sienta afortunada de formar parte de ella, por hacerme sentir parte de esta piña. María José, Marga y, por supuesto, Marta, que sienten suyos cada uno de mis pasos.*

*Mis padres y mi hermana, que me han enseñado el valor del esfuerzo y la constancia, que me han levantado en momentos peores y se han alegrado conmigo en los mejores. Que me han enseñado a apreciar lo que tengo, lo que me rodea y a valorar los pasos que voy dando. Nada de lo que hago sería posible sin ellos.*

*Y todos aquellos que de una u otra manera me han infundido ánimos y confiado en mí.*

*Por todos ellos, me incluyo entre las personas con fortuna.*

*Salamanca, Abril 2013*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1-Introducción.....</b>	<b>7</b>
1.1-Triptasas humanas: tipos descritos, procesamiento, activación y estructura. ...	8
1.1.1.-Tipos de triptasa descritos .....	8
1.1.2.-Estructura.....	18
1.1.3.- Procesamiento y activación .....	21
1.2.- Localización.....	26
1.3.-Sustratos e Inhibidores .....	29
1.4.-Función biológica .....	33
1.4.1.- Inflamación .....	33
1.4.2.- Inflamación alérgica de las vías respiratorias.....	35
1.4.3.- Angiogénesis .....	36
1.4.4.- Fibrosis .....	37
1.4.5.- Otros trastornos .....	37
1.5.- Genes de la triptasa, Genotipo y Regulación Transcripcional.....	37
1.5.1.- Genes de la triptasa .....	37
1.5.2.- Genotipos .....	47
1.5.3.- Regulación Transcripcional .....	49
1.6.-Importancia de los niveles de triptasa y patologías relacionadas.....	51
1.6.1.- Niveles de triptasa.....	51
1.6.2.- Patologías relacionadas con los niveles elevados de triptasa.....	53
<b>2- Hipótesis .....</b>	<b>61</b>
Hypothesis.....	61
<b>3- Objetivos .....</b>	<b>65</b>
Objectives.....	66
<b>4- Material y Métodos.....</b>	<b>69</b>
4.1.- Individuos incluidos en el estudio.....	69
4.1.1.- Paciente propósito de estudio .....	69
4.1.2.- Hermana, marido e hijas de la paciente.....	74
4.1.3.- Pacientes con enfermedades alérgicas .....	75

4.1.4.- Controles .....	75
4.2.- Datos del estudio .....	76
4.2.1.- Datos de filiación.....	76
4.2.2.- Datos clínicos y analíticos .....	76
4.3. Obtención de Muestras para el Estudio Molecular.....	82
4.3.1.- Extracción del ADN .....	82
4.3.2.- Extracción del ARN.....	84
4.4.- Estudio Molecular de <i>TPSAB1</i> .....	86
4.4.1.- PCR .....	86
4.4.2.- Purificación .....	92
4.4.3.- Clonación .....	93
4.4.5.- Secuenciación.....	96
4.4.6.- Análisis de RFLP ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i> ).....	98
4.4.7.- Estudio de expresión génica.....	101
4.5.- Bases de datos y plataformas analíticas.....	105
4.5.1.- Genome Browser .....	105
4.5.2.- Aceview .....	106
4.5.3.- Genecards® .....	107
4.5.4.- Ncbi .....	107
4.6.- Software para el diseño de oligonucleótidos.....	108
4.7.- Análisis de los datos.....	110
4.7.1.- Vector NTI.....	110
4.7.2.- BLAST .....	112
4.7.3.- SPSS.....	113
4.7.4.- SHEsis.....	114
4.7.5.- SNP analyzer .....	114
4.7.6.- Estudio del poder estadístico .....	115
4.7.7.- Análisis <i>in silico</i> del promotor .....	115
4.7.8.- Análisis <i>in silico</i> proteico .....	117
<b>5.- Resultados.....</b>	<b>121</b>
5.1.- Estudio descriptivo .....	121
5.1.1.- Características clinico-biológicas del grupo control .....	123

5.1.2.- Características clínico-biológicas del grupo de pacientes .....	124
5.2.- Estudio genético del gen <i>TPSAB1</i> en el grupo control. ....	126
5.2.1.- Identificación de polimorfismos de un único nucleótido (SNP) por secuenciación .....	126
5.2.2.- Estudio de haplotipos.....	136
5.2.3. Análisis de RFLP .....	138
5.3.- Estudio genético en individuos con niveles elevados de triptasa.....	141
5.3.1.- Estudio de la región promotora .....	142
5.3.2.- Estudio de la región genómica del gen <i>TPSAB1</i> en la familia con niveles elevados de triptasa.....	146
5.4.- Análisis de expresión del gen <i>TPSAB1</i> . ....	152
5.4.1.- Análisis cualitativo de expresión.....	152
5.4.2.- Análisis cuantitativo de expresión.....	153
5.5.- Análisis proteico .....	155
5.5.1.- Análisis del alineamiento de las secuencias proteicas .....	155
5.5.2.- Análisis de los dominios de la proteína .....	157
<b>6- Discusión.....</b>	<b>163</b>
6.1.- Selección e inclusión de individuos .....	163
6.2.- Diseño del estudio .....	164
6.3.- Análisis del gen <i>TPSAB1</i> en controles y pacientes. ....	165
6.3.1.- Estudio de haplotipos.....	167
6.3.2.- Análisis de RFLP.....	168
6.4.- Análisis del gen <i>TPSAB1</i> en pacientes con triptasa elevada. ....	169
6.4.1.- Análisis del promotor .....	170
6.4.2.- Región codificante .....	173
6.5.- Análisis de expresión .....	174
6.5.1.- Análisis cuantitativo.....	174
6.5.2.- Análisis de expresión cualitativo .....	175
6.6.- Análisis proteico .....	176
6.7.- Limitaciones del estudio.....	178
<b>7- Conclusiones.....</b>	<b>183</b>
Conclusions .....	185



<b>8-Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>189</b>
<b>9- Anexos .....</b>	<b>211</b>
Anexo I: Documento de recogida de datos.....	211
<b>10- Índice de Tablas.....</b>	<b>215</b>
<b>11- Índice de Figuras.....</b>	<b>221</b>
<b>12- Abreviaturas .....</b>	<b>229</b>

# INTRODUCCIÓN





## 1-INTRODUCCIÓN

La triptasa es una proteína perteneciente a la familia de las serin-proteasas relacionadas con la tripsina, de la que se diferencia en su forma, actividad y patrones de expresión. Esta proteína fue descrita por primera vez en el ser humano en mastocitos de pulmón, aunque previamente se había descrito una actividad *esterasa-triptica* en la encía y la piel humanas (1, 2) y en mastocitos de otros vertebrados(3). Mediante técnicas histoquímicas se observó, además, la liberación de proteasas en el pulmón tras una activación dependiente de IgE(4). A finales de la década de los 80 se caracterizó el gen que codifica la triptasa y su estructura proteica y se perfilaron sus funciones mediante estudios de ADNc (ADN complementario)(5-7). La triptasa constituye la mayor parte de las endopeptidasas almacenadas en los gránulos de secreción de los mastocitos y basófilos y es liberada durante el proceso de exocitosis, tanto por estímulos inmunológicos, que son los mejor caracterizados, mediados por IgE, como por estímulos no inmunológicos, entre los que se incluyen anafilatoxinas C5a y C3a, neuropéptidos, endotelina 1 (ET<sub>1</sub>), o de los receptores Toll-like o FcγRIII(8).

Las funciones de la triptasa dentro de la familia de las serin-proteasas aún no se conocen completamente. Los tipos celulares en los que se encuentra y su estructura condicionan enormemente los sustratos sobre los que actúa y las localizaciones en las que lleva a cabo su acción. Recientemente se le ha atribuido nuevos tipos de actividades en trastornos de carácter inmunológico como artritis, psoriasis y fibrosis(9-12). Estas entidades presentan un mayor o menor grado de

relación con la triptasa, sin que de ello se derive una relación causal, como en el caso del asma y otras enfermedades alérgicas(13). En estudios recientes se ha sugerido, además, la existencia de determinantes de susceptibilidad al asma en el cromosoma en el que se localiza el gen de la triptasa(14). Por tanto, el estudio de esta proteasa es importante ya que supone una prometedora diana para una futura intervención terapéutica en el ámbito de los fármacos antiinflamatorios.

## **1.1~TRIPTASAS HUMANAS: TIPOS DESCRITOS, PROCESAMIENTO, ACTIVACIÓN Y ESTRUCTURA.**

### **1.1.1.~TIPOS DE TRIPTASA DESCRITOS**

Las células donde se almacena principalmente la triptasa son los mastocitos que secretan fundamentalmente  $\alpha$ -triptasa y  $\beta$ -triptasa(2, 5-7, 14, 15), además de una proteína denominada triptasa transmembranaria (denotada como  $\gamma$ -triptasa o hTMT) que queda expuesta en la superficie celular tras el proceso de degranulación y de  $\delta$ -triptasa que es una proteasa con una actividad semejante a las anteriores, *trypsin-like*, pero cuyo significado biológico aún no ha sido vislumbrado.

De todas ellas se han descrito diferentes formas codificadas en distintos loci de los genes que codifican triptasa. Se han descrito al menos 10 proteínas ( $\alpha$ I,  $\alpha$ II,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\beta$ III,  $\gamma$ I,  $\gamma$ II, hTMT,  $\delta$ I,  $\delta$ II,) a partir de la secuenciación de los ADNc derivados de tejidos pulmonares y cutáneos (5-7). Entre las distintas enzimas se ha observado un alto grado de homología que se refleja en la tabla 1. Recientemente se ha descrito la triptasa  $\epsilon$  (16) por su elevada expresión de ARNm en células epiteliales, tráquea y esófago de adultos y en pulmón fetal; pero esta triptasa no se ha incluido en la enumeración anterior porque su transcripción no ha sido detectada en número

suficiente en mastocitos de los tejidos y la detección del nivel de enzima en cultivo de mastocitos HMC-1 es bajo (17).

**Tabla 1:** identidad entre las secuencias de las triptasas humanas (245 aminoácidos) descritas(17).

<b>h-βII</b>	<b>99</b>	<b>98</b>	<b>92</b>	<b>93</b>	<b>47</b>	<b>46</b>	<b>38</b>
	<b>h-βI</b>	98	93	94	47	46	38
		<b>h-βIII</b>	94	95	47	47	37
			<b>h-αI</b>	98	48	48	38
				<b>h-αII</b>	48	48	38
					<b>h-γI</b>	97	36
						<b>h-γII</b>	37
							<b>h-ε</b>

La triptasa mejor caracterizada y estudiada es la **β-triptasa**, y a menudo es a la que se hace referencia cuando se utiliza el término triptasa. Se sabe que es una proteína codificada tanto por el gen *TPSAB1* como por el *TPSB2*, conociéndose 3 β-triptasas, la βI, codificada por el primero y las βII y βIII codificadas por el segundo (Figura 1).

La diferencia entre ellas se basa en la secuencia de aminoácidos; en el caso de βI y βIII frente a βII la diferencia está en la posición 142, en la que las dos primeras formas tienen el aminoácido neutro asparagina (Asn) que supone un sitio de N-glicosilación, de tal manera que un oligosacárido se une a dicha posición. Mientras que, en la misma posición, la forma βII presenta el aminoácido lisina (Lys), de carga

positiva. Entre  $\beta I$  y  $\beta II$  respecto a  $\beta III$  existe otra diferencia en las posiciones 60-63, en la secuencia de aminoácidos. En esta última la secuencia es Arginina-Ácido aspártico-Arginina (Arg-Asp-Arg) mientras que las primeras presentan la secuencia Histidina-Glicina-Prolina (His-Gly-Pro).

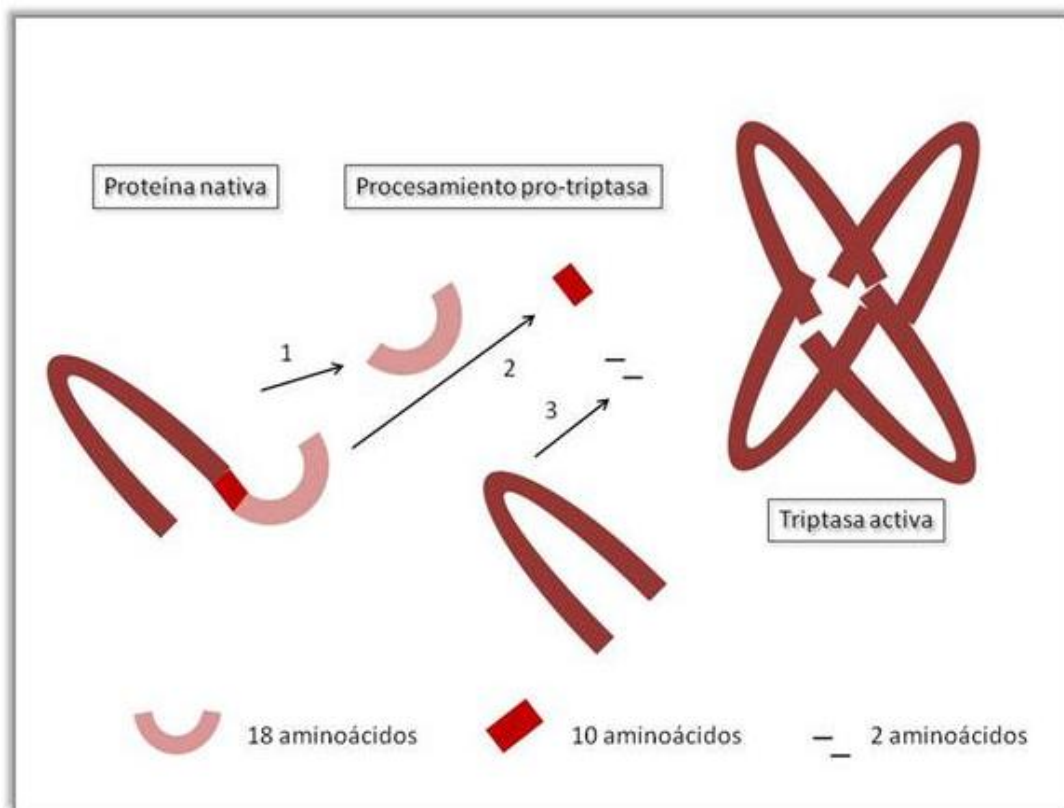
	(1)	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	102																					
TPS BETA I (1)		HLN	LLLL	ALP	VLAS	RAYAAP	APGQAL	QRVGI	VGGQEA	APRSK	WQVSL	RVH	CGPY	YUMH	FCGGS	LIHPQ	VVLTAA	HCVG	PDVKD	LAAL	RVQL	REQHL	YYQD	QLL									
TPS BETA II (1)		HLN	LLLL	ALP	VLAS	RAYAAP	APGQAL	QRVGI	VGGQEA	APRSK	WQVSL	RVH	CGPY	YUMH	FCGGS	LIHPQ	VVLTAA	HCVG	PDVKD	LAAL	RVQL	REQHL	YYQD	QLL									
TPS BETA III (1)		HLN	LLLL	ALP	VLAS	RAYAAP	APGQAL	QRVGI	VGGQEA	APRSK	WQVSL	RVRD	R	YUMH	FCGGS	LIHPQ	VVLTAA	HCVG	PDVKD	LAAL	RVQL	REQHL	YYQD	QLL									
	(103)	103	110	120	130	140	150	160	170	180	190	204																					
TPS BETA I(103)		PVS	RIIV	HPQF	YTAQ	IGAD	IALLE	EEP	V	VSSH	VHTV	TLPP	ASET	FPPG	MPCW	VTGW	GDVD	NDER	LPP	PF	PLK	QVK	VPI	INEN	HIC	DAK	YHL	GAY	TG	DD	VRI		
TPS BETA II(103)		PVS	RIIV	HPQF	YTAQ	IGAD	IALLE	EEP	V	VSSH	VHTV	TLPP	ASET	FPPG	MPCW	VTGW	GDVD	NDER	LPP	PF	PLK	QVK	VPI	INEN	HIC	DAK	YHL	GAY	TG	DD	VRI		
TPS BETA III(103)		PVS	RIIV	HPQF	YTAQ	IGAD	IALLE	EEP	V	VSSH	VHTV	TLPP	ASET	FPPG	MPCW	VTGW	GDVD	NDER	LPP	PF	PLK	QVK	VPI	INEN	HIC	DAK	YHL	GAY	TG	DD	VRI		
		210	220	230	240	250	260	275																									
		VRD	DMLC	AGN	TRR	DS	CG	DS	GG	PLV	CKV	NGT	WLQ	AG	VVS	WG	EG	CA	QPN	RPG	IY	TR	V	TY	YLD	W	I	H	H	V	P	K	K
		VRD	DMLC	AGN	TRR	DS	CG	DS	GG	PLV	CKV	NGT	WLQ	AG	VVS	WG	EG	CA	QPN	RPG	IY	TR	V	TY	YLD	W	I	H	H	V	P	K	K
		VRD	DMLC	AGN	TRR	DS	CG	DS	GG	PLV	CKV	NGT	WLQ	AG	VVS	WG	EG	CA	QPN	RPG	IY	TR	V	TY	YLD	W	I	H	H	V	P	K	K

**Figura 1.** Alineamiento de las distintas formas de  $\beta$ -triptasa en el que se evidencian las diferencias en su secuencia de aminoácidos.

La porción catalítica de esta enzima exhibe un alto grado de homología con la misma región de otros miembros de la superfamilia de las serin-proteasas.

Si se compara esta proteína con la  $\alpha$ -triptasa se ha observado que, en ésta, la unión al sustrato es ineficaz debido a la región Ser214-Gly219 (18); esta diferencia en actividad proteolítica puede ser debida, en parte, a la sustitución de un único aminoácido cercano al sitio activo, Asp216, que en la  $\alpha$ -triptasa reemplaza el residuo de Gly de las  $\beta$ -triptasas (19). Estudios con anticuerpos demuestran que la  $\alpha$ -triptasa está presente en niveles bajos en la circulación, incluso en ausencia de desgranulación.

La  $\beta$ -triptasa se encuentra almacenada en el gránulo en su forma activa, pero manteniéndose con escasa o nula actividad debido a un pH bajo y una estabilización a través de otras proteínas presentes en él. Es importante tener en cuenta que se expresa como una pre-proteína que posteriormente es procesada en el interior del gránulo a su forma madura al igual que otras proteasas de linfocitos y leucocitos.



**Figura 2.** Procesamiento de la forma inmadura de triptasa a la forma madura en el interior del gránulo del mastocito.

En el proceso de activación (figura 2) la  $\beta$ -preprotriptasa, que consta de 30 aminoácidos de péptido líder y 245 aminoácidos de región catalítica, es procesada a una forma activa, es decir, el precursor es sintetizado con un péptido N-terminal



seguido de un propéptido. En un primer paso, el fragmento “pre-pro” es convertido en un pro-forma mediante la eliminación de la secuencia del péptido señal de 18 aminoácidos. A diferencia de las triptasas de ratón (*mMCP-6* y *mMCP-7*), en las que se elimina una secuencia de 12 aminoácidos, en la triptasa humana es necesario eliminar un péptido señal de 18 aminoácidos de longitud (20).

Por tanto, el procesamiento de la triptasa humana puede resumirse como un proceso en el que tiene lugar la eliminación de un péptido señal, una autocatálisis de una secuencia peptídica que da lugar a una pro-forma de triptasa y, por último, la eliminación de dos aminoácidos, obteniéndose, en último término, un monómero de triptasa. Para este último paso es necesaria la presencia de la proteína catepsina C (CTSC) (21); este procesamiento termina con una Prolina<sup>-11</sup> en la posición P1. En experimentos con HCM-1 (que expresan las triptasas  $\beta$ I y  $\beta$ III, pero no  $\alpha$ -triptasa) se ha demostrado que los inhibidores de CTSC atenúan la formación de la triptasa activa. Por otra parte, los mastocitos de ratón deficientes en CTSC expresan proteasa mastocitaria murina (*mMCP*)-6 en niveles un 75 % inferiores a los modelos silvestres, lo que hace suponer que se requieren una o más vías de procesamiento con CTSC (22), aumentando la posibilidad de un procesamiento alternativo de enzimas para la  $\beta$ -protriptasa en humanos.

La activación proteolítica de la pro-*mMCP-6* (proteasa de ratón utilizada en los distintos estudios relacionados con la triptasa humana) se considera un proceso intracelular no bien definido, que da como resultado la pérdida del propéptido del zimógeno (23). Por otra parte si la  $\alpha$ -protriptasa es procesada a la forma madura *in*

vivo, el posible mecanismo por el que se produce aún permanece sin ser completamente dilucidado.

Una vez que la enzima se encuentra en su forma madura y los monómeros son secretados, estos monómeros de triptasa unidos de forma no covalente constituirán un tetrámero, que es estabilizado *in vitro* mediante concentraciones salinas elevadas o *in vivo* mediante proteoglicanos ácidos. Cuando no existen estos cofactores en el medio, dicha estructura se disocia en monómeros, que inicialmente fueron considerados inactivos, pero los estudios de Fajardo y cols (24) han demostrado la formación de monómeros activos de  $\beta$ -triptasa.

La siguiente proteína en importancia es la  **$\alpha$ -triptasa**, de la cual se han descrito dos isoenzimas muy similares denominadas  $\alpha 1$  y  $\alpha 11$ . Esta triptasa predomina en basófilos (25) aunque en los mastocitos, en los que se encuentra en menor cantidad, se libera de manera constitutiva como pro-forma.

Pese a la mínima diferencia existente entre la  $\alpha$ -triptasa y la  $\beta$ -triptasa, que comparten un 93-96% de su secuencia de aminoácidos, el residuo existente en la posición 216 representa una diferencia importante en cuanto a la activación, secreción y actividad. En este sentido, la  $\alpha$ -triptasa cuenta con un aminoácido de tipo ácido, el ácido aspártico (Asp) mientras que la  $\beta$ -triptasa posee en la misma posición uno de tipo apolar, la glicina (Gly), por lo que la menor actividad en comparación con el anterior tipo de triptasa es parcialmente atribuible a esta sustitución (12).

La  $\alpha$ -triptasa no se encuentra almacenada en los gránulos secretores, por lo que su secreción es constitutiva. Debido a esto, la proteína se encuentra presente

en niveles bajos en la circulación, que se mantienen uniformes tras un fenómeno de desgranulación, sin verse afectados por la liberación brusca de mediadores mastocitarios contenidos en los gránulos. La diferencia con la  $\beta$ -triptasa, almacenada en gránulos secretores y liberada mediante desgranulación, parece residir en los propéptidos de la  $\alpha$ -triptasa (Gln, Glutamina, en posición 3) y la  $\beta$ -triptasa (Arg, Arginina, en la misma posición); la primera de estas enzimas presenta un extremo N-terminal con procesamiento defectuoso debido a que el péptido de dos aminoácidos no puede ser eliminado por el DPPI y, por ello, es secretada directamente(21).

El hecho de que esta proteína presente la mencionada variación génica hace que se dificulte su eliminación y activación. Por ello, no se utiliza de manera habitual como marcador de la cantidad de gránulos de los mastocitos y de su carga o de su activación aguda. Además, es menos probable que desempeñe un papel en la fisiopatología de la anafilaxia, a diferencia de la  $\beta$ -triptasa (26).

La  **$\gamma$ -triptasa** es una enzima codificada por el gen *TPSG1*, pero está menos relacionada con el resto de las triptasas. Por ejemplo, la homología con la  $\alpha/\beta$ -triptasa es de tan solo un 48 % de similitud proteica. Se han descrito dos isoformas,  $\gamma I$  y  $\gamma II$  (27). La característica más destacable de esta enzima es que su extremo C-terminal, que se ancla a la membrana, está seguido de una pequeña cola citoplasmática, de unos 23 residuos, lo que provocará que una vez que se produzca la desgranulación la proteína quede en la superficie celular del mastocito. Se ha comprobado que la homología en la estructura primaria de esta proteína con las

formas  $\alpha$  y  $\beta$ II de la triptasa es baja, compartiendo una similitud mayor con la prostatina.

La  $\gamma$ -triptasa cuenta con un péptido señal de 38 aminoácidos, 19 en la pre-región y los mismos en la pro-región, además de una región madura de 282 aminoácidos. Las diferencias existentes en la secuencia aminoacídica entre las triptasas descritas se refleja en la figura 3.

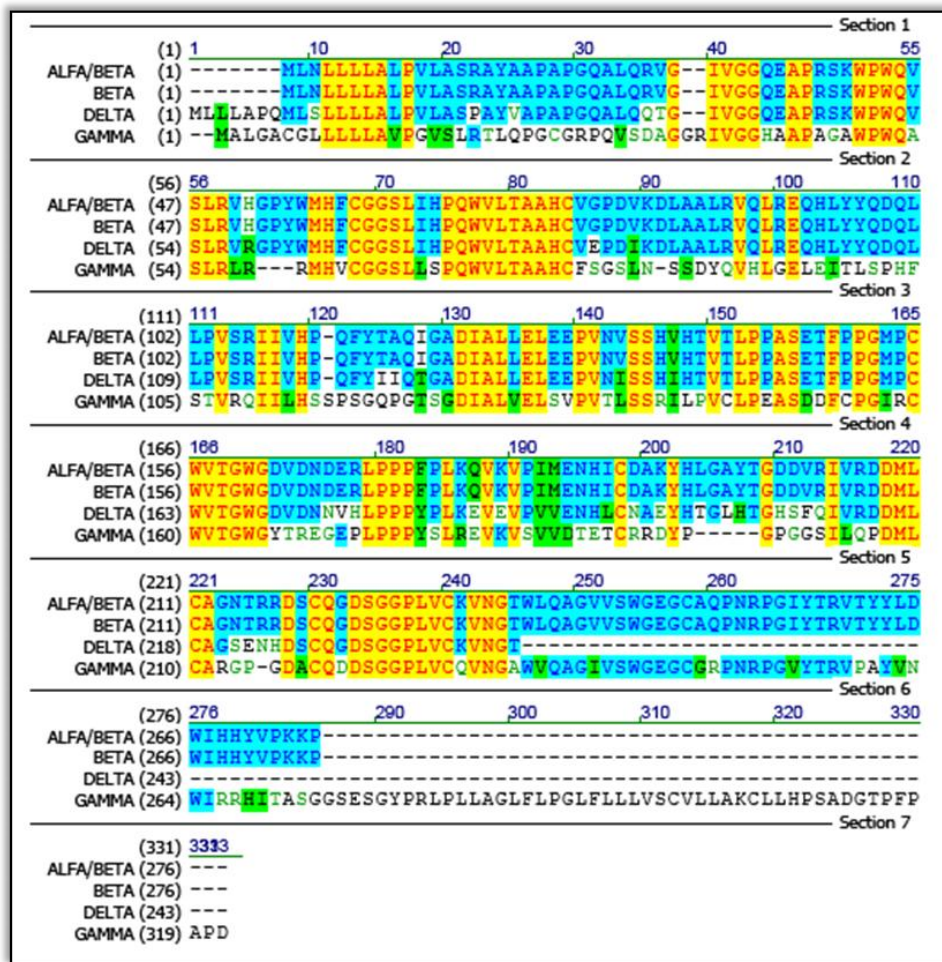


Figura 3. Alineamiento de las secuencias de las distintas triptasas (obtenido de <http://www.uniprot.org/uniprot>).

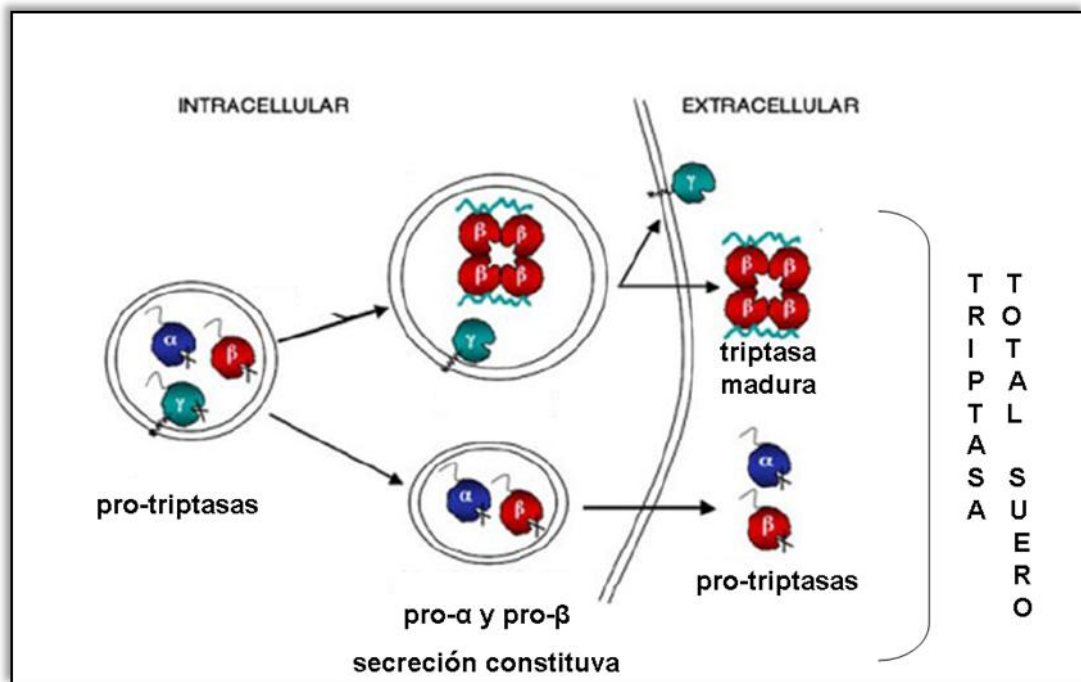
Otra triptasa descrita es la codificada por el gen *TPSD1*, que da lugar a la  $\delta$ -**triptasa**; de ella se conocen dos isoformas,  $\delta I$  y  $\delta II$ , cuya diferencia se basa en un único aminoácido. Es una enzima relacionada principalmente con la secuencia de aminoácidos de la  $\alpha$ -triptasa (existe más del 80% de identidad entre ambas triptasas). Es importante destacar que, en la misma posición que diferencia a  $\alpha$ -triptasa de  $\beta$ -triptasa, la presencia de Glutamina (Gln) hace que la  $\delta$ -triptasa sea secretada de manera constitutiva en forma de zimógeno.

Esta triptasa es una proteína madura más corta que el resto de las serín-proteasas descritas, debido a que posee un codón de parada prematuro, que provoca un acortamiento de la secuencia de 40 aminoácidos. Este hecho afecta significativamente a la especificidad por los sustratos (28), como los péptidos sintéticos, pese a que la triada catalítica no se ve afectada. El proceso de activación de estas proteínas se refleja en la figura 4.

Por estudios de inmunohistoquímica se sabe que la  $\delta$ -triptasa se expresa principalmente en los mastocitos, en tejidos como el colon, el pulmón y el corazón y en líneas celulares como HMC-1, que son células carentes de  $\alpha$ -triptasa. En estas localizaciones la actividad de la  $\delta$ -triptasa es reseñable. Pero aún está en estudio el plegamiento, actividad y/o estabilidad de esta proteína, que es evidentemente más corta que cualquier otra serín-proteasa.

Las triptasas de ratón han servido, mediante estudios *in vitro* e *in vivo*, para determinar su función biológica, sustratos e inhibidores entre otros. Entre ellas destacan la **mMCP-6**, exclusivamente expresada en mastocitos de tejido conectivo (29), la **mMCP-7**, que fue la primera descrita en cultivos de mastocitos derivados de

médula ósea (BMMCs) (30), la **mTMT** (o Prss31) cuyo gen fue localizado en el cromosoma 17 del genoma de ratón y la **mMCP-11** (o Pssr 34) expresada también en BMMCs (31).



**Figura 4.** Activación de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -triptasa. Las protriptasas inactivas que se encuentran en el retículo endoplasmático y pueden seguir vías reguladoras o vías secretoras constitutivas. La  $\beta$ -triptasa se procesa por eliminación del propéptido dando lugar a una forma catalíticamente activa que, junto con la participación de la heparina, estabiliza el tetrámero en la forma completamente activa y es almacenada en los gránulos secretorios junto con otros mediadores. La  $\gamma$ -triptasa se activa por eliminación de un propéptido, de tal manera que permanece asociada a la membrana. La  $\alpha$ -triptasa posee una variación génica que previene la eliminación del propéptido; por lo tanto es, secretada directamente, junto con la pro- $\beta$ -triptasa residual. Tras la secreción, las triptasas  $\beta$  maduras forman parte del torrente circulatorio y son detectadas mediante inmunoanálisis, junto con la pro- $\alpha$  y pro- $\beta$ . En la liberación del gránulo, la  $\gamma$ -triptasa permanece anclada a la superficie externa de la membrana del mastocito (26).

### 1.1.2.~ESTRUCTURA

Como se ha comentado, la triptasa es secretada como una estructura tetramérica, ya sea como homo o heterotetrámero, formada por cuatro unidades iguales o distintas (unidades de  $\alpha$  o  $\beta$ -triptasa), respectivamente, de monómeros de esta proteína (actualmente se ha demostrado también *in vivo*). La enzima, purificada a partir de técnicas de dispersión y purificación de mastocitos obtenidos de tejidos sólidos, tiene una masa molecular de 140-142 kDa y está constituida por subunidades idénticas de 30-36 kDa (17); esta estructura ha sido revelada en estudios realizados bajo condiciones de desnaturalización y no desnaturalización. En los estudios preliminares se ha estimado la composición de aminoácidos en torno a 17 tipos distintos. Se han encontrado 251 residuos ácidos, 103 básicos, 415 con cadenas alifáticas no polares, 99 residuos contienen anillos aromáticos, 277 consisten en Serina, Glicina, Treonina, mientras que 18 de todos los residuos poseen sulfuro en sus cadenas; por otro lado los niveles encontrados de Triptófano y de Cisteína son mínimos.

Aunque la estructura sea tetramérica se ha constatado, mediante técnicas de cristalografía, que no se trata de una estructura compacta, como se había publicado en los estudios previos al año 2000, sino que los monómeros se disponen en las esquinas de una estructura rectangular plana, con los sitios activos orientados hacia el poro central (40 Å x 15 Å). Además, cabe señalar que los residuos que codifican la triada catalítica, es decir, los sitios activos, están codificados por exones distintos (7).

Para que la conformación sea viable resulta indispensable la existencia de proteoglicanos de heparina u otros polímeros con elevada densidad de carga, que estabilicen al tetrámero. La ausencia de heparina hace que el complejo se disocie en monómeros, como se ha referido previamente, aunque estudios posteriores han demostrado que la  $\alpha$ -triptasa es más estable, de modo que los tetrámeros de esta enzima son estables tanto en ausencia como en presencia de los inhibidores del sitio activo (32).

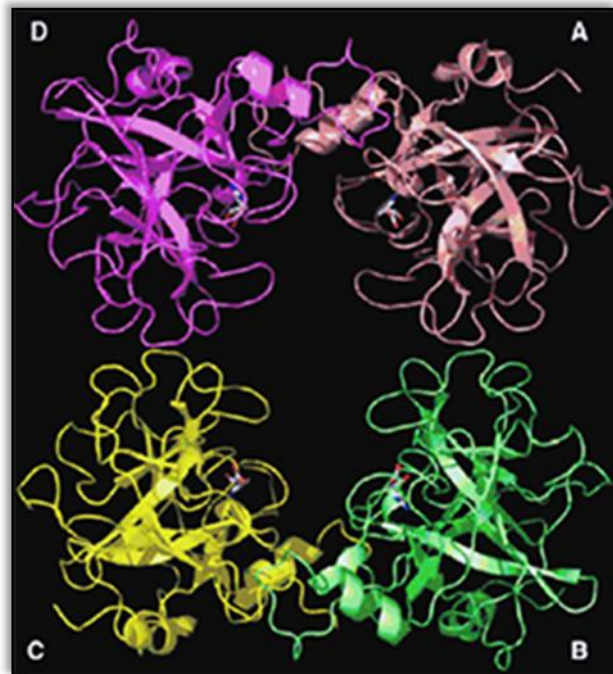
Se han realizado distintas aproximaciones con el fin de establecer un modelo estructural, de tal manera que residuos de Triptófano y las regiones ricas en Prolina se encuentran implicadas en la interacción entre subunidades. Se cree que la unión con la heparina está mediada por entre diez y trece residuos de Histidina, localizados en la conexión entre los monómeros.

Pese a que el tetrámero de triptasa está constituido por cuatro subunidades, entre ellas se pueden distinguir dos tipos de interacciones. A cada una de las unidades se le asigna una letra (A, B, C o D) de manera arbitraria, según se muestra en la figura 5. La superficie entre los monómeros A y D (o B y C) está estabilizada por interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y puentes salinos sin participación de la heparina. Esta interacción se produce entre el bucle 173 y 97 de cada uno de los monómeros y entre los bucles número 60 de ambos monómeros.

Por otra parte, las interacciones entre A-B y C-D son equivalentes y están basadas principalmente en interacciones hidrofóbicas con un contacto pequeño entre las superficies. Las interacciones son relativamente débiles, por lo que es necesaria la heparina. En estas superficies se ven implicados los bucles



denominados 147, 70, 80 y 37 de ambos monómeros. La simetría es prácticamente perfecta, sólo existen unos residuos de Tirosina en la posición 75 entre las interacciones anteriores que modifican ligeramente el ambiente de cada monómero en la estructura. Además de la debilidad de la unión, presumiblemente esta superficie es desestabilizada por las cargas opuestas de dos residuos de Arginina (posición 150) que se encuentran situados de forma opuesta.



**Figura 5.** Representación de la estructura tridimensional del tetrámero de triptasa; los monómeros que la constituyen se disponen en las esquinas de un rectángulo plano, con sus centros activos orientados hacia el centro. Tomado de Hallgren y cols, 2006 (12).

Cada monómero de triptasa presenta el plegamiento establecido como modelo en otras proteasas similares y en serin-proteasas; la diferencia con estas otras proteínas se establece por seis bucles, que son distintos en cuanto a

conformación y longitud. Es importante localizar estos bucles, ya que se encuentran en el borde del sitio activo y a su vez realizan los contactos con los monómeros vecinos (33).

*In vivo*, el tetrámero es secretado por los mastocitos unido a proteoglicanos de heparina (34); estos polisacáridos estabilizan el tetrámero por unión de residuos cargados positivamente que se disponen a ambos lados de la superficie y forman un “parche” orientado oblicuamente en la periferia que se extiende a uno de los lados de cada monómero.

Esta formación puede ser de gran importancia en ambientes de pH ácido, tales como las vías respiratorias de los pacientes asmáticos, que son zonas pobremente vascularizadas, o en el tratamiento de heridas o tumores sólidos; por lo que estos hallazgos pueden tener importantes consecuencias para conocer el papel fisiológico de la triptasa e indispensable para el diseño de inhibidores para el tratamiento de las enfermedades en las que puedan estar implicados los mastocitos.

### **1.1.3.- PROCESAMIENTO Y ACTIVACIÓN**

El ensamblaje del tetrámero es un paso clave en el proceso de activación de la triptasa. No se conoce la localización celular, pero es razonable pensar que está relacionada con la activación del propéptido. En estudios realizados con triptasa de ratón (*mMCP-6*) se encontró que dicha *tetramerización* y la consecuente activación enzimática dependen notablemente del pH y de la heparina. Este proceso sólo tiene lugar con valores de pH por debajo de 6,5 y en presencia de heparina. A 37°C en plasma o suero fisiológico se disocia en monómeros activos (35)

Tras los estudios iniciales en triptasa de ratón, estudios realizados con triptasa  $\beta$ I y  $\beta$ II demostraron que estos dos tipos de triptasa también dependen en gran medida de la heparina y de un pH ácido. La razón para esta intensa dependencia permanece sin aclarar, pero parece que la interacción de los residuos de Histidina con la heparina pueda estar implicada ya que, a un pH ácido, se encuentran cargados positivamente, mientras que carecen de carga si el pH es neutro.

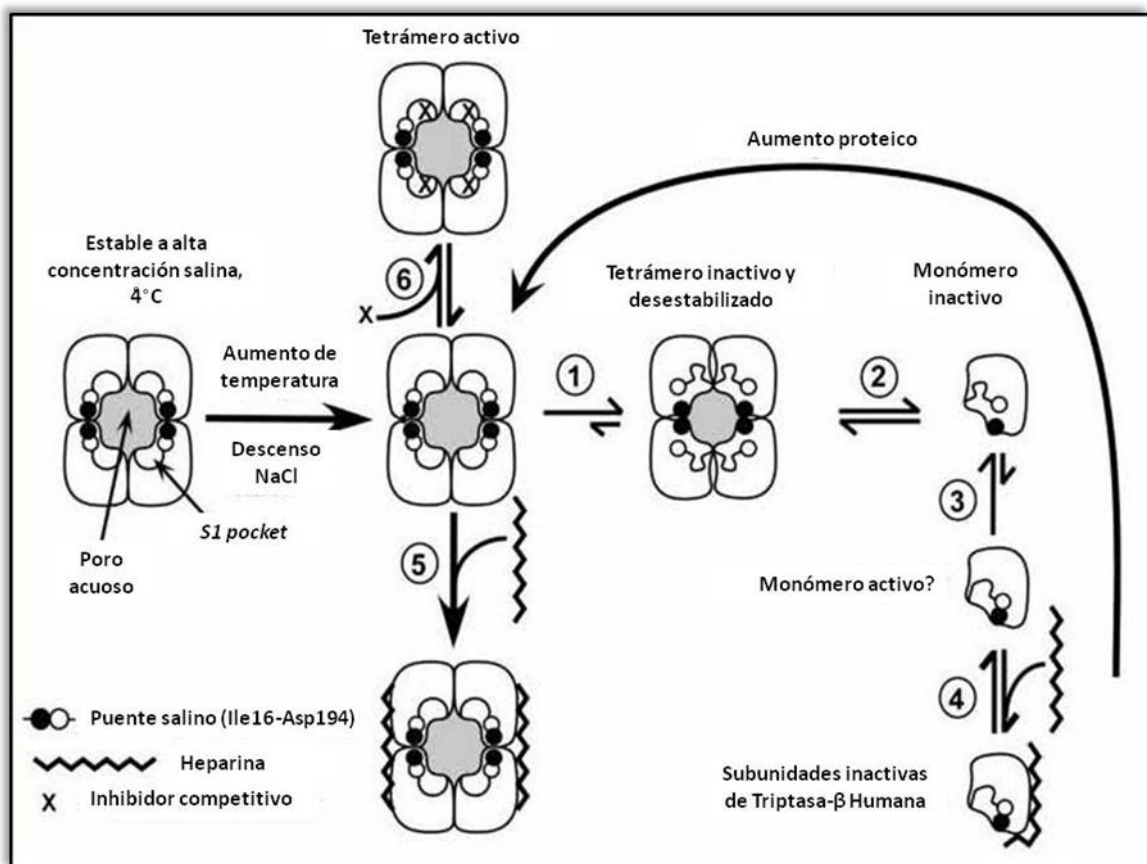
Aunque los experimentos se han basado en cadenas de heparina de distinta longitud, comparándolas con otras moléculas como el heparán sulfato, el dermatán sulfato y el condroitín sulfato, se ha comprobado que estos compuestos, que están menos sulfatados que la heparina, son peores activadores de la triptasa; de tal forma que una elevada sulfatación hace que la activación de la triptasa se realice con mayor éxito (36).

En cuanto a la longitud de la molécula de heparina hay mayor probabilidad de que cristalicen los complejos triptasa-heparina cuanto mayor sea esta última. La curva dosis-respuesta inducida por la heparina para la activación de la triptasa es campaniforme, lo que indica que la heparina actúa mediante la unión de más de un monómero de esta proteína simultáneamente (36), siendo la longitud mínima para la unión de dos monómeros de triptasa de al menos 20 monosacáridos, para una posterior *tetramerización*, pero son 8-10 oligosacáridos la longitud mínima necesaria para la unión de una única molécula de triptasa. La interpretación de estos hallazgos es que la heparina une fuertemente triptasa sólo a pH bajo causando una *tetramerización* que da lugar a una activación enzimática.

Selwood y cols (37) han propuesto la disociación del tetrámero como un proceso que, de manera espontánea, puede tener lugar en tres pasos. El primero, considerado reversible, implica cambios conformacionales en un tetrámero desestabilizado, que puede ser reactivado por la heparina. En el segundo paso, también reversible, se produce la disociación del tetrámero desestabilizado. Por último, en un tercer paso, de carácter irreversible, los monómeros pasan a un estado en el que no pueden ser reactivados. Es de destacar que la estabilización del tetrámero es sólo efectiva en el caso de la  $\beta$ -triptasa; por el contrario, los tetrámeros de  $\alpha$ -triptasa son estables tanto en presencia como en ausencia de inhibidores de sitios activos. Los mismos autores han demostrado que la  $\alpha$ -triptasa, a diferencia de la  $\beta$ II, es más estable y no se disocia en dichos monómeros, por lo que parece ser completamente independiente de la heparina para su estabilidad (38). Esto puede deberse a las diferencias existentes entre ambas enzimas en el sitio activo. Muchos de los mecanismos implicados en la estabilización del tetrámero pueden dar lugar a una inactivación espontánea que llevará asociados cambios conformacionales, relacionados con la unión del sustrato con el sitio activo, que podrán ser revertidos por la adición de heparina o dextrán sulfato.

La organización del tetrámero de  $\beta$ -triptasa se conserva en presencia de pequeños inhibidores (39), interactuando con el sitio activo de triptasa. Estos son compuestos policatiónicos como la antitrombina, lactoferrina, mieloperoxidasa o polímeros sintéticos antagonistas de heparina, que pueden competir con la triptasa para la unión de proteoglicanos y desestabilizar e inhibir el tetrámero, proceso cuya actividad está limitada *in vivo*.

A pesar de que se considera que el fenómeno de inactivación del tetrámero ocurre en tres pasos, se sugiere que la disociación de la forma activa a monómeros inactivos ocurre inmediatamente al comienzo del fenómeno y bajo condiciones de baja concentración de sales, de tal manera que la enzima rápidamente pierde actividad, pero puede recuperarla débilmente si se suplementa el sistema con heparina (40). Estudios llevados a cabo por Schwartz y cols (35) defienden que la inactivación de la enzima y consecuente disociación de las subunidades ocurre a bajas concentraciones de tripsasa mientras que la autodegradación se favorece a elevadas concentraciones de la enzima (figura 6).



**Figura 6.** Modelo que describe la relación entre el tetrámero de  $\beta$  tripsasa humana y los productos de la inactivación espontánea. Tomado de Schechter y cols (41).

La heparina y otros proteoglicanos son indispensables para la activación y estabilidad de la enzima y se ha propuesto que el mecanismo de acción se basa en la producción de cambios conformacionales en la triptasa, dando lugar a interacciones entre las subunidades. El éxito de la actividad enzimática se fundamenta en dichos cambios; no obstante, los cambios estructurales dependientes de la heparina no han sido completamente identificados.

*In vivo*, la disociación de la triptasa de la heparina puede tener lugar por el desplazamiento de la triptasa por sustancias de tipo básico que se unen con más fuerza a la heparina o gracias a la degradación de la heparina por heparinasa u otros metabolitos reactivos del oxígeno (42). Alternativamente, los complejos de los proteoglicanos de heparina y triptasa pueden ser reutilizados por los mastocitos o degradados por células fagocíticas más activas como neutrófilos o eosinófilos atraídos hacia las áreas de liberación mastocitaria. La estabilización de la triptasa por heparina es la primera función de este polianión, que se relaciona con la existencia en los gránulos de mastocitos en asociación con proteasas neutras y puede considerarse un hecho crítico para la cronificación de la inflamación que sigue a la desgranulación mastocitaria *in vivo*.

Los hallazgos relacionados con la estructura de la proteína han hecho suponer que el monómero de triptasa puede existir en su forma activa cuando concurren determinadas condiciones (temperatura en torno a 37°C, un pH neutro y ausencia de moléculas de heparina o con una longitud inferior a 8 monosacáridos), de tal manera que es accesible para los inhibidores proteicos macromoleculares que inhibirían la actividad de estos monómeros.

Los monómeros presentan diferencias evidentes en cuanto a su actividad y comportamiento con respecto al tetrámero de la triptasa; son menos restrictivos para la escisión de sustratos concretos, resistentes al tetrámero y, al menos teóricamente, más susceptibles de ser inhibidos por inhibidores proteicos macromoleculares. La activación de estos monómeros puede producirse *in vivo* por una reactivación de los monómeros inactivos inducida por heparina; por contacto de los monómeros inactivos de triptasa con varios tipos de proteoglicanos presentes en los tejidos conectivos o superficies celulares, e incluso la reactivación puede comenzar con tetrámeros activos que se inactivan para finalmente ser disociados en monómeros inactivos (pasos reversible e irreversible, respectivamente) (24, 43), aunque con la adición de heparina se puede recuperar cierta actividad (40), como se ha demostrado en análisis posteriores de la cinética de la  $\beta$ -triptasa.

En resumen, en ausencia de heparina y con un pH de 7,4 los tetrámeros se convierten en monómeros inactivos, probablemente a través de intermedios tetraméricos inactivos, y no se excluye que sea también a través de un monómero activo intermedio. Los monómeros de  $\beta$ -triptasa comienzan a activarse a bajas concentraciones cuando el pH se aproxima a 6,0 e interviene la heparina; los monómeros inactivos de  $\beta$ -triptasa se convierten, también, en activos a elevadas concentraciones.

## **1.2.~ LOCALIZACIÓN**

La triptasa es la serín-proteína que constituye el mayor componente de los gránulos secretores de mastocitos (2, 4), por esta razón la triptasa es un marcador

selectivo de estas células (25). Uno de los criterios utilizados para la clasificación de los mastocitos se basa en los ambientes de diferenciación para definir las poblaciones mastocitarias. Los mastocitos se han caracterizado en función de las proteasas contenidas en sus gránulos, de tal manera que se distinguen dos tipos: aquellos que contienen triptasa, quimasa, carboxipeptidasamastocitaria y catepsina G, que son los llamados mastocitos de los tejidos conectivos ( $MC_{TC}$ ), y aquellos que contienen únicamente triptasa y no presentan ninguna otra proteasa, que son los mastocitos de las mucosas ( $MC_T$ ) (41); en todos los casos se ha comprobado que los tipos de triptasa presentes son el tipo  $\alpha$  y tipo  $\beta$ . Estas subclases de mastocitos pueden diferenciarse también por su localización histológica: los primeros aparecen en la piel y submucosa intestinal mientras que los que únicamente contienen triptasa han sido localizados en pulmón e intestino (44). Por otra parte es necesario indicar que se han descrito unos mastocitos denominados  $MC_C$  que sólo contienen quimasa y carboxipeptidasa, aunque este hecho permanece sin confirmar y no será de interés en este trabajo debido a que no contienen triptasa (20, 33).

Las diferencias entre los dos tipos principales de mastocitos radican no sólo en su contenido en proteasas sino en distintos aspectos que podrían explicar su expresión diferencial. La diferencia fundamental a la hora de establecer nuevas dianas para el desarrollo de fármacos para el tratamiento del asma o de otras enfermedades en las que intervenga este tipo celular es que los distintos tipos de mastocitos presentan una respuesta diferencial frente a determinados fármacos, como el cromoglicato disódico o la teofilina; mientras la desgranulación de los  $MC_{TC}$  es bloqueada por estos compuestos, los  $MC_T$  no presentan inhibición de la liberación del contenido de los gránulos.



Como se ha comentado, la presencia de determinados proteoglicanos en los gránulos secretores es indispensable para mantener la estabilidad de la triptasa. En el subtipo de mastocitos localizado en los tejidos conectivos predomina la heparina; en el de las mucosas, el condroitín-sulfato.

La triptasa presente en los basófilos, supone únicamente 0,05 picogramos por célula (pg/cell) (45), frente a un total de entre 11 y 35 pg/cel que contienen los mastocitos de pulmón o piel respectivamente (46-48). Aunque los mastocitos y los basófilos son células procedentes de la médula ósea, la maduración de los primeros se produce únicamente en los tejidos, lo que complica su aislamiento. En los dos tipos celulares se ha descrito la expresión de receptores en la superficie celular, indispensables para la sensibilización por el alérgeno mediada por IgE. En ambos casos se ha descrito la presencia de histamina (49) y de heparina, que se sabe indispensable para la estabilidad de la triptasa como tetrámero.

Además de los tipos celulares anteriores también se han detectado niveles bajos de triptasa en líneas celulares leucémicas KU812 y niveles medios en HMC-1, en los que se han detectado transcritos de  $\beta$ -triptasa (25).

Los distintos tipos de triptasa son almacenados tanto en los basófilos, si bien en menor cantidad, como en los gránulos secretores de los mastocitos, en una forma completamente procesada. En estos compartimentos han de asegurarse una serie de condiciones para garantizar una baja actividad enzimática de las proteasas allí contenidas para evitar el daño celular. El pH en el interior del gránulo ha de ser bajo (alrededor de 5,5), y debe contener cantidades variables de heparina, necesaria para la estabilización de la triptasa en su forma procesada.

### 1.3.~SVSTRATOS E INHIBIDORES

Diversos estudios han intentado identificar *in vitro* los sustratos sobre los que actúa la triptasa por medio del estudio de las diferencias entre las distintas formas de  $\beta$ -triptasa. La nomenclatura utilizada sigue la propuesta por Schechter y Berger (50), de modo que denominan posición P1 al residuo N-terminal junto al sitio de rotura y el residuo P1' se localiza en el extremo C-terminal. Por tanto el P1-P1' constituye un sitio de escisión, P2, P3 son residuos localizados más hacia el final del extremo N-terminal y P2' P3' se localizan hacia el final del sitio de rotura del extremo C-terminal.

Estas formas de triptasa tendrían, por tanto, preferencia similar por los sustratos que no son dependientes del aminoácido presente en la P1; además, presentan preferencia por Pro en la posición P4, hecho que no se ha observado en ninguna otra serina. En la posición P3 la triptasa presenta preferencia por aminoácidos cargados positivamente, mientras que en la posición P2 muestra una modesta predilección por la Asparragina (51). Esto se ha explicado por estudios de cristalografía (52) de modo que el sitio de glicosilación permanece cercano al sitio activo lo que debería tener mínimo efecto sobre la especificidad al sustrato.

Además del tipo de triptasa, su estructura y características tridimensionales condicionan su especificidad por los sustratos, ya que el acceso de éstos a los sitios activos que se localizan en el poro central de la enzima se ve limitado por el tamaño de éste. Esta proteína se incluye dentro del grupo de las *proteasas compartimentalizadas*, un pequeño grupo de enzimas proteolíticas que constituyen compartimentos derivados de la asociación entre sus unidades constituyentes y

que, de esa manera, disponen los sitios activos hacia el interior de dichos compartimentos (53); los perfiles de los sustratos guardan semejanza con los que se le atribuyen a la quimasa. Por ejemplo, la triptasa puede degradar fibronectina (54, 55), aunque otros estudios sugieren que sólo los monómeros de triptasa tienen esa capacidad (38, 56). También esta proteasa puede desnaturalizar colágeno, en concreto el colágeno de tipo VI (57). Otra de las similitudes con la quimasa es que se ha demostrado que degrada un número de péptidos bioactivos, como VIP (péptido vasoactivo intestinal), el péptido histidina-metionina (PHM) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (*calcitonin gene-related peptide*, CGRP) (58, 59). Por último, la triptasa también está implicada en la degradación de lipoproteínas, debido a que es capaz de romper los componentes apolipoproteicos de la lipoproteína de alta densidad (*high-density lipoprotein*, HDL).

Uno de los sustratos mejor caracterizados es el **fibrinógeno**. En 1985 se demostró que el fibrinógeno era degradado por la triptasa de pulmón humano y que éste perdía su capacidad coagulante (60). En estudios realizados sobre triptasas de ratón (*mMCP-7*) se ha comprobado que éstas prolongan el tiempo de coagulación cuando se añade al plasma, por lo que se sugiere un papel en la regulación de la coagulación sanguínea (61). Otro de los papeles de la triptasa en la coagulación puede tener lugar a otro nivel, por activación proteolítica del activador plasminógeno-urikinasa(62).

De los sustratos conocidos de triptasa, el **receptor PAR-2** ha sido el que más ha centrado la atención. PAR-2 pertenece a un grupo de receptores de la superficie celular (PAR-1, PAR-2, PAR-3 y PAR-4) que están expuestos a un ligando que, tras

romper la unión a su receptor, induce la transmisión de señales. Varios estudios *in vitro* han demostrado que la triptasa tiene la capacidad de actuar sobre este receptor (63-65). PAR-2 está constituido por dos proteínas G y puede ser activado por la triptasa por la rotura de la secuencia Ser-Lys-Gly-Arg, que da lugar a la proliferación de fibroblastos, mientras que el receptor PAR-1 es inactivado por esta proteína por su secuencia Pro-Asn-Asp-Lys (51, 65). Posteriormente, se obtuvo la evidencia de que PAR-2 puede ser, de hecho, un sustrato *in vivo* para la triptasa. En estudios con ratones se demostró que la triptasa puede causar inflamación a través de la activación de PAR-2 (66) y, en ratones deficientes en este receptor, fue capaz de provocar inflamación intestinal (67).

La triptasa también actúa induciendo varios eventos de transmisión de señales de la vía de las MAP kinasas (68-70), MEK, fosfatidilinositol 3 kinasa y ERK1/2 (71).

Se han descrito otros sustratos sobre los que la triptasa lleva a cabo su actividad como RANTES, que inhibe la actividad quimiotáctica de eosinófilos (72). Recientes estudios indican que la triptasa puede procesar la pre-elafina a elafina activa, un inhibidor que se ha relacionado con el asma (73).

Estudios con triptasa  $\beta$ I y  $\beta$ II recombinante ha permitido determinar la secuencia óptima para la rotura por parte de esta proteasa: P4 Pro, P3 Arg/Lys, P2 X y P1 Lys/Arg. Esta secuencia es útil para el desarrollo de herramientas farmacológicas que faciliten el estudio de la triptasa.

Una búsqueda en la base de datos de proteínas Swiss-Prot revela otros sustratos fisiológicos que pueden considerarse candidatos, ya que contienen las

secuencias predichas para la rotura por parte de  $\beta$ -triptasa. Estas macromoléculas no se han caracterizado empíricamente como sustratos, pero moléculas como la proteína de unión al *latent transforming growth factor* (citocina moduladora), la anexina I y II (proteínas de unión a calcio que participan en la regulación de respuestas inflamatorias tempranas) y HGF (factor de crecimiento implicado en el desarrollo de tumores y su progresión y angiogénesis) son interesantes, ya que pondrían de manifiesto el papel de la triptasa en la remodelación tisular (51).

De igual manera que se han estudiado los sustratos sobre los que actúa la triptasa se han desarrollado y estudiado **inhibidores** de la misma, de modo que se ha avanzado en el conocimiento de fármacos gracias a las dianas farmacológicas descritas.

Uno de los primeros inhibidores caracterizados fue APC-366, un péptido monovalente que carece de selectividad para la triptasa, desarrollado bajo ensayos clínicos para el tratamiento del asma (74). El mecanismo de inhibición probablemente implica la formación de una unión covalente entre el inhibidor y la enzima (75, 76). Además de este inhibidor, se han utilizado otros para el tratamiento de la inflamación de las vías respiratorias y otras condiciones patológicas, como son el BABIM y RWJ-56423 (77-79). Debido a la baja selectividad de estas moléculas por la triptasa no es posible determinar si el efecto *in vivo* se debe a la inhibición concreta de esta proteasa o de otras dianas. A partir de la descripción de la estructura cristalográfica de la  $\beta$ -triptasa se han diseñado inhibidores bivalentes que interaccionan con dos de los sitios activos del poro central, un ejemplo de estos

fármacos es AMG-126737, que bloquea la hiperrespuesta derivada de la estimulación con el alérgeno en experimentos con cobayas y ovejas (80, 81).

Otro de los inhibidores de triptasa es LDTI (*Leech-derived tryptase inhibitor*), una pequeña proteína que se ha descrito como inhibidora de la estructura tetramérica al actuar de manera directa sobre el centro activo (82). Por otra parte, los antagonistas de la heparina se consideran inhibidores de triptasa porque su requerimiento de heparina imposibilita su disponibilidad para el tetrámero de triptasa (12).

## 1.4.~FUNCIÓN BIOLÓGICA

Dado que la triptasa es un componente mayoritario en los gránulos secretores de los mastocitos es lógico estudiar los procesos en los que se produce la desgranulación de estas células y la repercusión de la misma en fenómenos patológicos.

Para ello se ha analizado la correlación de la triptasa con ciertos procesos biológicos, la respuesta de animales o tejidos a la exposición a la triptasa purificada y la modulación de los procesos biológicos frente a los inhibidores de triptasa. Un resumen de las principales funciones de la triptasa se refleja en la tabla 2.

### 1.4.1.~ INFLAMACIÓN

La triptasa ha sido ligada a una gran variedad de trastornos, principalmente de tipo **inflamatorio**; tales implicaciones se han abordado desde tres perspectivas diferentes: a) estudios en los que la presencia de triptasa muestra una correlación con determinados procesos biológicos, b) experimentos en los que la exposición de

animales o tejidos expuestos a triptasa purificada ha dado lugar a respuesta biológica y c) estudios en los que los inhibidores de triptasa han demostrado modulaciones del proceso. El significado de los hallazgos *in vivo* de estos estudios, aun no ha sido demostrado en muchos casos.

**Tabla 2:** procesos biológicos en los que la triptasa está implicada (12)

	Niveles elevados de triptasa	La triptasa induce el proceso	Inhibidor de triptasa inhibe la respuesta
Inflamación de vía respiratoria. Hiperrespuesta	+	+	+
Reclutamiento de neutrófilos		+	
Reclutamiento de eosinófilos		+	
Aumento de la permeabilidad vascular		+	
Fibrosis	+		
Sepsis			
Colitis ulcerosa			+
Angiogénesis		+	
Esclerosis Múltiple	+		
Distrofia Muscular de Duchene	+		
Artritis	+		
Inflamación intestinal			+
Dermatitis atópica	+		
Proliferación celular en tumor		+	
Prurito		+	

En analogía con la quimasa, varios estudios han determinado actividades proinflamatorias de la triptasa. La inyección de triptasa humana en la piel de cobayas induce el reclutamiento de neutrófilos y eosinófilos (83). Con este mismo

modelo, se ha demostrado actividad proinflamatoria asociada con el incremento de infiltración microvascular (84). Estudios independientes lo han demostrado con triptasa de ratón (*mMCP-6*), y otros ensayos han comprobado que la  $\beta$ -triptasa humana recombinante en tráquea de ratón provoca inflamación neutrofilica (85).

En ovejas induce inflamación cutánea y los inhibidores de triptasa reducen dicha inflamación cutánea en animales alérgicos (86). En estos estudios, es importante considerar el estrés que provoca la triptasa utilizada, cuyo origen es de la misma especie que el animal de experimentación, sugiriendo que las reacciones observadas imitarían lo que puede ocurrir después de la liberación de triptasa *in vivo* (12).

Los mecanismos que subyacen en estos fenómenos no se conocen completamente pero se ha sugerido que la triptasa podría estimular la expresión de IL-8 e ICAM en células endoteliales (87, 88) y que también induce la desgranulación de los mastocitos en respuesta a canales de calcio o receptores de IgE (89), así como también puede provocar desgranulación en los eosinófilos (90).

#### **1.4.2.~ INFLAMACIÓN ALÉRGICA DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS.**

Distintos estudios sugieren el papel de la triptasa de mastocitos en la **inflamación alérgica de las vías respiratorias**. Esto ha sido fuertemente respaldado con la demostración de que dos inhibidores diferentes de triptasa, APC-366 y BABIM, actuaban suprimiendo las respuestas inflamatorias y la hiperreactividad bronquial provocada por el antígeno en ovejas alérgicas (77). Se ha demostrado que la administración de triptasa humana induce broncoconstricción mediada por la liberación de histamina y que ésta respuesta puede ser suprimida por APC-366 (86,



91). Además, se han desarrollado otros inhibidores más potentes y selectivos entre los que se incluyen AMG-126737 y MOL-6131, que suprimen la respuesta en las vías respiratorias en modelos animales. Esta selectividad se obtiene por el desarrollo de inhibidores dibásicos, que interactúan simultáneamente con los dos sitios activos en el tetrámero.

Otros estudios sobre el papel de la triptasa en las vías respiratorias fueron llevados a cabo por Berger y cols (91) mostrando que la exposición de bronquios humanos aislados a la triptasa provoca hiperreactividad similar a la histamina y, en la misma línea, que la triptasa muestra efectos similares en bronquios de cobayas (92).

### 1.4.3.~ ANGIOGÉNESIS

Otro de las funciones en las que se considera implicada la triptasa es en la **angiogénesis**, ya que se ha demostrado que promueve crecimiento capilar y puede ser un mitógeno de células endoteliales (9).

El papel pro-angiogénico de la triptasa puede ser clave para procesos fisiológicos como la cicatrización de heridas y para procesos patológicos como la progresión tumoral. Se ha demostrado que esta proteína induce la síntesis de quimiocinas pro-angiogénicas y no de quimiocinas anti-angiogénicas (11). Además, se ha descrito una correlación entre la angiogénesis y las neuronas triptasa-positivas y microvasos en modelo múrido de distrofia muscular de Duchene, una enfermedad genética ligada al cromosoma X caracterizada por degeneración muscular y daño cerebral (10).

#### 1.4.4.~ FIBROSIS

La triptasa también se considera implicada en la **fibrosis**. Se ha descrito como un mitógeno para fibroblastos y puede estimular la síntesis de colágeno (93, 94). La posibilidad de que la triptasa pueda jugar un papel en condiciones fibróticas, como es el asma alérgica, ha sido largamente discutida (95).

#### 1.4.5.~ OTROS TRASTORNOS

Por último se ha establecido una relación potencial entre la triptasa de los mastocitos y una variedad de trastornos, incluida la esclerosis múltiple (96), artritis (97), síndrome de la muerte súbita del lactante (98), psoriasis (99), fibrosis (100) y dermatitis atópica (101).

### 1.5.~ GENES DE LA TRIPTASA, GENOTIPO Y REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL.

#### 1.5.1.~ GENES DE LA TRIPTASA

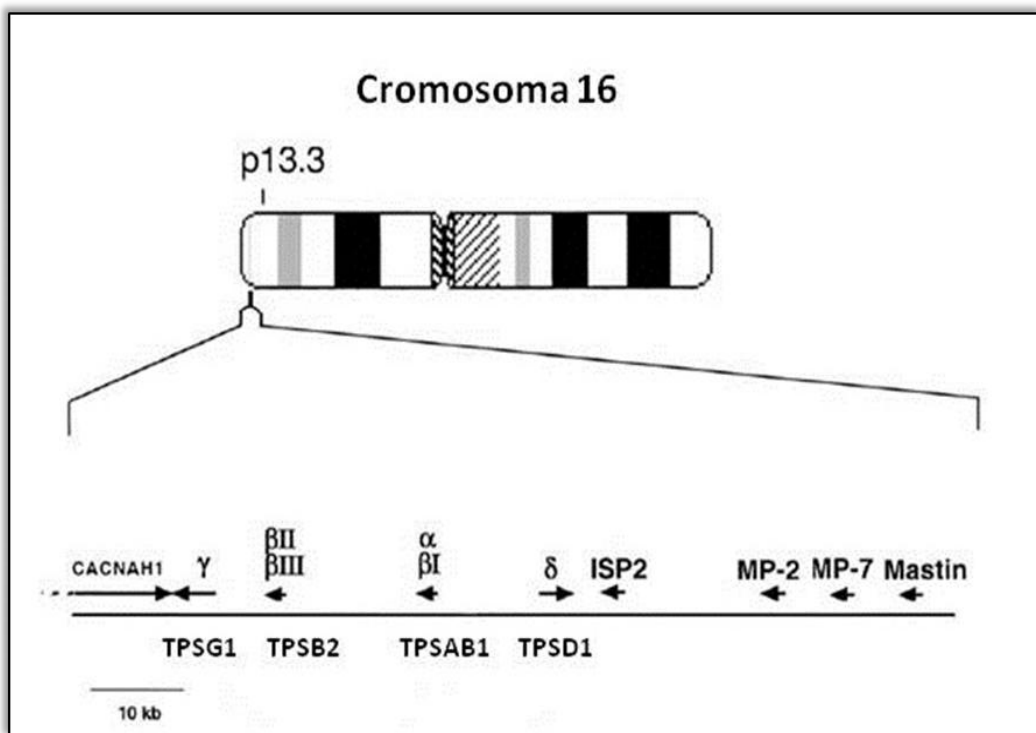
Se han identificado enzimas de mastocitos con actividad triptásica en diferentes especies: humano, perro, ratón, rata, gerbil, oveja y vaca. La caracterización de sus genes codificantes se ha llevado a cabo fundamentalmente mediante clonación de ADN complementarios (ADNc).

La localización cromosómica de dichos genes se conoce a partir de la amplificación de ADN de células somáticas híbridas de ser humano y hámster (5). Se han descrito al menos cuatro genes agrupados en el extremo del brazo corto de dicho cromosoma 16 en posición 16p13.3. Esta región está compuesta por tres repeticiones, una directa y dos invertidas, la más larga de 10 kb. Los genes

conocidos se localizan en una banda junto a una región de aproximadamente 1,2 Mb desde el extremo del brazo corto de dicho cromosoma. La región cercana al locus de los genes de triptasa es una región rica en secuencias repetitivas, una de las regiones más complicadas de ensamblar y secuenciar en el proyecto del genoma humano (102). Existen datos de que en las inmediaciones del complejo génico (*cluster*) de la triptasa se produce un número inusual de eventos, entre los que se incluyen fenómenos de recombinación y rotura cromosómica durante la replicación, retraso de síntesis o separación de cromátidas, así como resistencia a la clonación y secuenciación (5, 7, 14, 103). Por todo ello, los loci de los genes de triptasa mastocitaria humana son más complejo que los de la  $\alpha$ -quimasa (7). En la región centromérica, directamente en relación a estos genes aparecen elementos *tryptase-like* que parecen ser pseudogenes (104).

Los genes de este complejo poseen una región denominada 3'UTR (*untranslated region*, región no traducida), notablemente conservada, que no se ha encontrado en otras serín-proteasas. También presentan una región 5'UTR que posee repeticiones de 19 pares de bases ricas en guanina, que se consideran indispensables para regular los elevados niveles de expresión de la proteasa específica de los mastocitos. Estudios recientes sugieren que las repeticiones son propias de estos genes, porque no se han detectado en ninguna otra ubicación. Se ha sugerido que la notable conservación de estas zonas reflejaría una función reguladora de la expresión de cada gen de la triptasa y que contribuye a la estabilidad del ARNm (14). También existe la posibilidad de que esté sometida a procesos de ajuste (*splicing*, corte y empalme) alternativo (105).

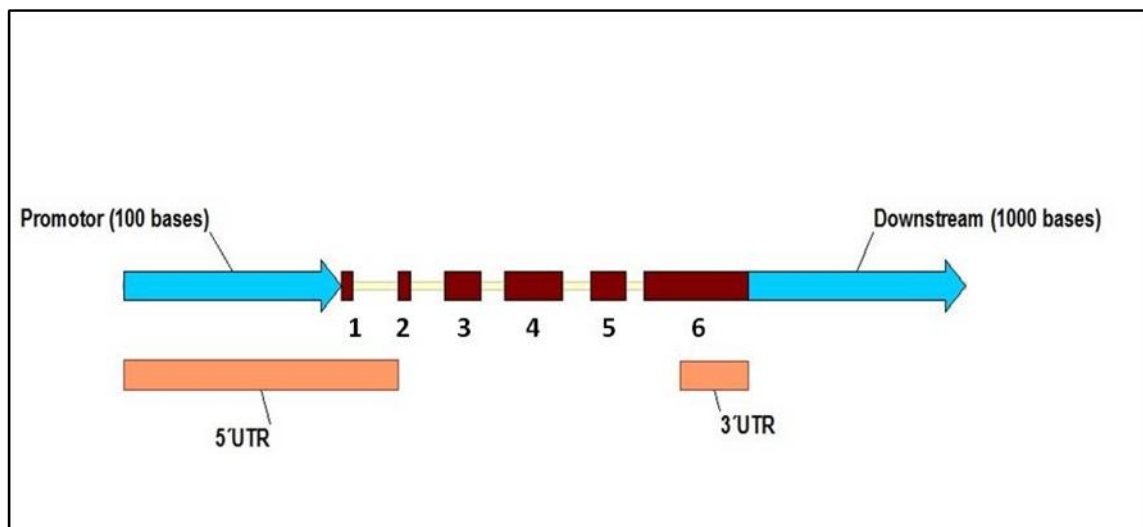
Tras diferentes estudios y afirmaciones controvertidas se ha establecido que el genoma humano contiene tres loci de genes de triptasa de mastocitos transcritos y traducidos activamente, denominados  $\alpha/\beta$ ,  $\beta$ II/ $\beta$ III y  $\gamma$  (102). Adicionalmente, en la región cercana al centrómero junto a esta región, aparecen los que en un principio se consideraron pseudogenes, incluyendo  $\delta$  (*TPSD1*), que posee un exón similar al gen de la triptasa de mastocito-7 de ratón (*mMCP-7*), muchos de los cuales han evolucionado por mecanismos de conversión génica a un gen similar al de  $\alpha$  y  $\beta$ , con la excepción de un codón de stop prematuro (14).



**Figura 7.** Posición relativa de los genes que codifican la triptasa en el cromosoma 16.

Los estudios de secuenciación, caracterización y alineamiento de solapamientos de fragmentos del cromosoma 16p13.3 contenidos en cromosomas

artificiales bacterianos (BACs), junto con la identificación y caracterización de fragmentos de restricción y el análisis por métodos de PCR de las isoformas de la triptasa han permitido concluir que los alelos que codifican las  $\alpha$  y  $\beta$ -triptasas se encuentran en equilibrio y pertenecen a un mismo gen, *TPSAB1* (13), mientras que los alelos que codifican las  $\beta$ II y  $\beta$ III-triptasas, se encuentran en *loci* adyacentes (26, 106). La localización de los genes mencionados en el cromosoma se refleja en la figura 7.



**Figura 8.** Esquema del gen *TPSAB1*. Los exones se representan con cajas rojas y se numeran del 1 al 6; entre ellos, con una línea pálida, se representan los intrones. En ambos extremos se representan con flechas azules la región del promotor y 1000 pares de bases en sentido 3'. Las cajas inferiores representan las regiones 5' UTR y 3' UTR.

Respecto a la estructura génica, se puede afirmar que los genes de la triptasa responden a un patrón de seis exones y cinco intrones con la fase intrónica y el tamaño altamente conservado, incluyendo un intrón situado en sentido 5' del codón

de inicio de la transcripción. El mencionado intrón separa el sitio de inicio de la transcripción de la secuencia codificante, lo que supone una característica específica de este gen (14) (figura 8). La posición y fase de los cuatro intrones en la región codificante de los genes de triptasa son similares a los de tripsina y a los genes de la calicreína glandular, pero diferentes de otros genes de serín proteasa.

En todos los genes de triptasa descritos hasta ahora los codones que codifican los residuos de la triada catalítica se localizan en exones separados, en los denominados 3, 4 y 6 (17).

Como se ha comentado, el gen **TPSAB1** codifica ambas triptasas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y entre los alelos que codifican ambas formas se han establecido unas diferencias principales. La secuencia nucleotídica correspondiente a la forma  $\alpha$  presenta: a) una delección de 10-11 pares de bases en el intrón 4; b) un sitio de restricción para la enzima *SacII* en el exón 3 (14); y c) una secuencia en el exón 4 reconocida por la enzima de restricción *EcoRV* identificable como RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción); la digestión mediada por esta enzima permite diferenciar entre la forma  $\alpha$ , que sería escindido en dos fragmentos, y la forma  $\beta$ , que no es digerida por esta enzima (13). Cuando se comparó el ADNc de la  $\alpha$ I con el de la  $\alpha$ II-triptasa se comprobó que existen ligeras diferencias en el exón 5 (107). Las diferencias entre estas formas se recogen en la figura 9.

El gen **TPSAB1** tiene un tamaño de 1878 pares de bases (pb), a diferencia del gen **TPSB2**, que codifica la  $\beta$ II-triptasa y  $\beta$ III-triptasa, supone una excepción a la norma, ya que su estructura está constituida por siete exones, de los cuales sólo seis son codificantes, presenta un tamaño de 1850 pb y una homología con **TPSAB1**

del 90%. Otro de los genes descritos en este cromosoma es el gen que codifica la  $\delta$ -triptasa, *TPSD1*, que se considera actualmente un gen codificante, y que consta de cinco exones, todos ellos codificantes y cuyo tamaño ha sido estimado en 222 pb(28).

$\alpha$ I	GGACGTCAAG	GATCTGGCCA	CCCTCAGGGT	GCAACTGCCG	GAGCAGCACC	50
$\alpha$ II	GGACGTCAAG	GATCTGGCCA	CCCTCAGGGT	GCAACTGCCG	GAGCAGCACC	50
$\beta$ I	GGACGTCAAG	GATCTGGCCG	CCCTCAGGGT	GCAACTGCCG	GAGCAGCACC	50
$\beta$ II	GGACGTCAAG	GATCTGGCCG	CCCTCAGGGT	GCAACTGCCG	GAGCAGCACC	50
$\beta$ III	GGACGTCAAG	GATCTGGCCG	CCCTCAGGGT	GCAACTGCCG	GAGCAGCACC	50
$\alpha$ I	TCTACTACCA	GGACCAGCTG	CTGCCAGTCA	GCAGGATCAT	CGTGCACCCA	100
$\alpha$ II	TCTACTACCA	GGACCAGCTG	CTGCCAGTCA	GCAGGATCAT	CGTGCACCCA	100
$\beta$ I	TCTACTACCA	GGACCAGCTG	CTGCCAGTCA	GCAGGATCAT	CGTGCACCCA	100
$\beta$ II	TCTACTACCA	GGACCAGCTG	CTGCCAGTCA	GCAGGATCAT	CGTGCACCCA	100
$\beta$ III	TCTACTACCA	GGACCAGCTG	CTGCCAGTCA	GCAGGATCAT	CGTGCACCCA	100
$\alpha$ I	CAGTTCCTACA	TCATCCAGAC	TGGAGCGGAT	ATCGCCCTGC	TGGAGCTGGA	150
$\alpha$ II	CAGTTCCTACA	TCATCCAGAC	TGGAGCGGAT	ATCGCCCTGC	TGGAGCTGGA	150
$\beta$ I	CAGTTCCTACA	CGGCCAGAT	CGGAGCGGAC	ATCGCCCTGC	TGGAGCTGGA	150
$\beta$ II	CAGTTCCTACA	CGGCCAGAT	CGGAGCGGAC	ATCGCCCTGC	TGGAGCTGGA	150
$\beta$ III	CAGTTCCTACA	CGGCCAGAT	CGGAGCGGAC	ATCGCCCTGC	TGGAGCTGGA	150
$\alpha$ I	GGAGCCCGTG	APCATCTCCA	GCCGCGTCCA	CACGGTCAATG	CTGCCCCCTG	200
$\alpha$ II	GGAGCCCGTG	APCATCTCCA	GCCGCGTCCA	CACGGTCAATG	CTGCCCCCTG	200
$\beta$ I	GGAGCCCGTG	APCGTCTCCA	GCCGCGTCCA	CACGGTCAACC	CTGCCCCCTG	200
$\beta$ II	GGAGCCCGTG	APCGTCTCCA	GCCGCGTCCA	CACGGTCAACC	CTGCCCCCTG	200
$\beta$ III	GGAGCCCGTG	APGCTCTCCA	GCCGCGTCCA	CACGGTCAACC	CTGCCCCCTG	200

**Figura 9.** Diferencias en la secuencia nucleotídica entre los alelos que codifican los distintos tipos de triptasa(13).

Por último, el gen *TPSG1*, que codifica la triptasa  $\gamma$ , está localizado en el extremo del brazo corto del cromosoma y es similar al anterior en cuanto al número de exones y a cuáles de ellos son codificantes, pero su tamaño es ligeramente mayor, en torno a 3606 pb. Su organización génica difiere de *TPSAB1* y de *TPSB2* en que contiene una inserción en los intrones 4 y 5, y que su quinto exón está más relacionado con el de *mMCP-7* (triptasa- proteasa de mastocito de ratón). Este gen

está estrechamente relacionado con el que codifica la prostatina humana, una proteasa expresada en tejidos como la próstata, el hígado, el riñón, el pulmón y el páncreas (27). La diferencia más significativa con respecto al resto de genes de esta familia es que éste codifica un dominio carboxilo terminal de naturaleza hidrofóbica, lo que puede determinar su anclaje a la membrana. Se ha relacionado por su proximidad en el brazo del cromosoma con una región circundante a un gen que codifica un canal de calcio que también se localiza en la membrana (108).

### *ISOFORMAS DEL GEN TPSAB1*

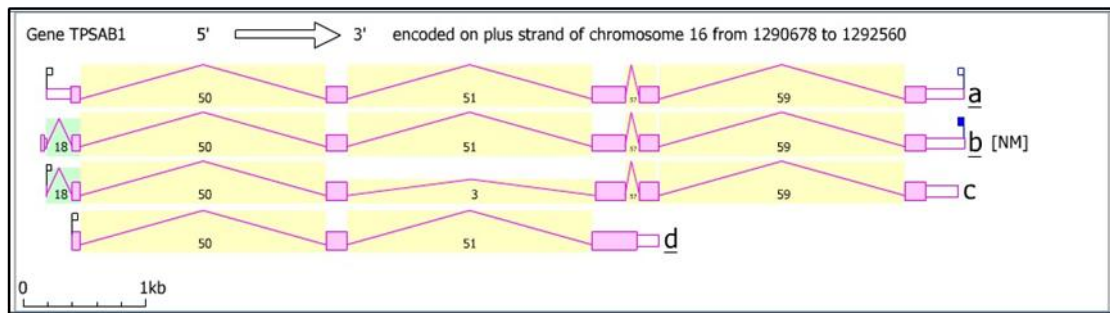
El gen *TPSAB1* contiene 6 intrones distintos limitados por las secuencias consenso (GT-AG). La transcripción da lugar a 4 ARNm por ajuste (*splicing*) alternativo (figura 10). Existen probablemente dos promotores alternativos, 2 últimos exones no solapantes y 2 sitios de poliadenilación alternativos. Los ARNm descritos son diferentes por solapamiento de exones con diferentes límites. La eficacia de la transcripción puede reducirse por la presencia de un producto de traducción más corto (uORF) que comienza en el AUG en sentido 5' del principal marco de lectura.

En la figura 10, de manera esquemática, los intrones se representan por líneas discontinuas; al inicio de cada intrón se refleja el número relativo de clones que se han encontrado para dicho intrón. En líneas quebradas y de color rosa se representa un intrón con las secuencias consenso (GT-AG o GC-AG). En línea azul se representa los intrones no estándar con límites no consenso AT-AC o de otro tipo.

Los exones representados por cajas rosas indican regiones codificantes del gen que se traducen en proteína, las cajas vacías delimitadas por líneas rosas



representan la región 5'UTR (a la izquierda) y 3'UTR (a la derecha). Las “banderas” identifican sitio de poliadenilación en los sitios 3' y 5'. Las “banderas” con color corresponden a los eventos frecuentes mientras que las vacías han sido validadas por menos ADNc; en el extremo 3', las banderas negras están asociadas a la señal principal AATAAA. Las “banderas” azules indican una variante de un único nucleótido con respecto de la secuencia principal.



**Figura 10.** Splicing alternativo del gen TPSAB1 descrito en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/>

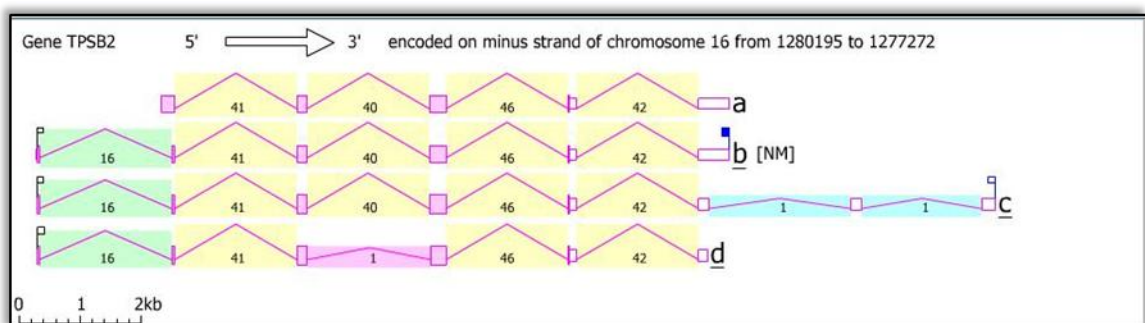
Las isoformas descritas se han denominado *a*, *b*, *c* o *d* y se diferencian en estructura, tamaño y lugares de expresión. La variante *a* se ha descrito en cerebro, pulmón, testículo, mezcla de sangre adulta, ovario, páncreas y *pool* de músculo (esquelético y cardiaco). La variante *b* se ha descrito en estómago, en células pobremente diferenciadas de adenocarcinoma, ojo, páncreas y pulmón. La variante *c* se ha encontrado en pulmón y tronco del simpático, mientras que la última de las variantes, *d*, se ha descrito en piel. En la tabla 3 se refleja las diferencias existentes en la estructura de cada una de las formas alternativas del gen.

De manera análoga al gen *TPSAB1*, el gen *TPSB2* se ha descrito a partir de 103 clones de ADNc. La isoforma *a* ha sido descrita en ovario, páncreas, pulmón, testículo, islotes pancreáticos, y en una mezcla de tejidos musculares y de cerebro. La isoforma *b* ha sido localizada en adenocarcinoma, estómago, pulmón, colon y páncreas. La isoforma *c* está presente en muestras de cerebro, en testículo, ojo, cáncer de mama y pulmón mientras que la *d* se ha encontrado en el tronco del simpático

**Tabla 3:** Diferencias en la estructura entre las distintas isoformas descritas del gen *TPSAB1*.

	Tamaño ARNm	Proteína predicha	5'UTR	3'UTR	ARNm	Secuencia 3'
<b>a</b>	1351 bp	282 aa	189 bp	313 bp	1825 bp	1 kb
<b>b</b>	1199 bp	275 aa	52 bp	319 bp	1883 bp	
<b>c</b>	1086 bp	266 aa	9 bp	276 bp	1797 bp	
<b>d</b>	790 bp	199 aa		190 bp	1052 bp	

De igual manera, se han descrito distintas formas para el gen *TPSB2*, que se reflejan en la figura 11, y las diferencias en estructura en la tabla 4.



**Figura 11.** Splicing alternativo del gen *TPSAB1* descrito en

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/>

En términos generales, el gen contiene diversos sitios consenso GT-AG distintos y la transcripción produce 4 ARNm de ajuste alternativo. Existen 2 exones alternativos que se solapan y dos sitios de poliadenilación validados.

En el año 2008 (105) se han llevado a cabo análisis del ajuste alternativo que tiene lugar en los genes de triptasa humana. *A priori* se han identificado patrones de ajuste conservados en cuatro formas de triptasa ( $\alpha$ II,  $\beta$ I,  $\beta$ III y  $\delta$ I), que representan tres genes distintos. La observación de que la existencia de pocos genes da lugar a muchos transcritos ha hecho pensar que modificaciones post-traduccionales o por la generación de múltiples formas de ARNm a partir de un transcrito primario son responsables de este fenómeno.

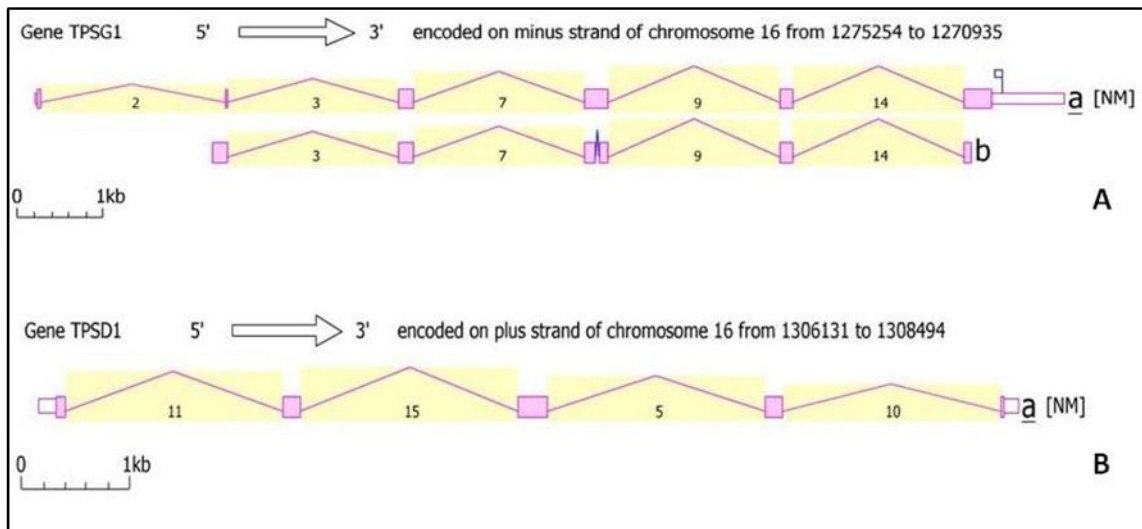
**Tabla 4:** diferencias en estructura entre las distintas formas del gen *TPSB2* descritas.

	Tamaño ARNm	Proteína predicha	3'UTR	ARNm	Secuencia 3'
<b>a</b>	1313 pb	232 aa	614 pb	1787 pb	1 kb
<b>b</b>	1177 pb	185 aa	617 pb	1861 pb	
<b>c</b>	1211 pb	182 aa	661 pb	2914 pb	
<b>d</b>	766 pb	168 aa	257 pb	1477 pb	

También se han descrito isoformas para el gen *TPSG1* y *TPSD1*, que se reflejan en la figura 12.

Como consecuencia del ajuste alternativo se produce una delección de 27 nucleótidos de una región interna del ARNm (si se compara con la secuencia completa) lo que da lugar a una secuencia con 9 aminoácidos menos en la proteína

resultante de la traducción. Este patrón de ajuste es consecuencia de la supresión de un sitio normal de ajuste en sentido 3' en el intrón 3 y la activación de un sitio alternativo en sentido 3' en el exón 4 (105); lo que concuerda con el hecho de que una buena parte de estos fenómenos (20 %) tienen como resultado la inserción o deleción en la parte central de la proteína, hecho ampliamente conservado en el genoma humano (109).



**Figura 12. A:** isoformas del gen *TPSG1*. **B:** isoformas del gen *TPSD1*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/>

### 1.5.2.~ GENOTIPOS

Una vez descritos los genes que codifican la triptasa varios estudios posteriores procedieron a establecer los genotipos presentes en distintas poblaciones en función de los dos genes que codifican las triptasas principales y cuya función biológica ha sido y está siendo vislumbrada.

Estudios realizados por Trivedi y cols (110) parten del hecho de que  $\alpha$  y  $\beta$ I están restringidos al gen *TPSAB1* y que  $\beta$ II y  $\beta$ III se restringen al gen *TPSB2*. Este grupo describe una forma de  $\beta$ III truncada ( $\beta$ III<sup>F5</sup>) que carece de 109 aminoácidos y que comprende un dominio catalítico que la inactiva enzimáticamente y, además, establecen la distribución de alelos y haplotipos en distintas poblaciones. De este modo, concluyen que existe un fuerte desequilibrio de ligamiento entre ambos genes, de manera que los haplotipos posibles se restringen a una fracción de los realmente obtenidos experimentalmente. De hecho, los diplotipos obtenidos con mayor frecuencia ( $\alpha$ - $\beta$ II y  $\beta$ I- $\beta$ III) responden a un modelo previamente establecido para el *cluster* de la triptasa, pero los haplotipos obtenidos con menor frecuencia no son consistentes con el modelo aceptado anteriormente.

Los experimentos llevados a cabo por Soto y colaboradores (13) determinaron el genotipo de una población basándose en las propiedades de la forma  $\alpha$  para ser reconocida por la enzima de digestión *EcoRV*, que la escinde en dos fragmentos. El genotipo de los individuos carentes de la forma  $\alpha$  ( $\beta\beta\beta\beta$ ) es más frecuente de lo que se espera *a priori* y afecta a un 29 % de los individuos estudiados, mientras que los que presentan los genotipos  $\alpha\beta\beta\beta$  y  $\alpha\alpha\beta\beta$  suponen un 21 y un 50 %, respectivamente, del total de la población. Estos hallazgos se han intentado correlacionar con los niveles de triptasa en suero de los individuos, de modo que aquellos individuos con genotipo  $\alpha\alpha\beta\beta$  pueden tener niveles de triptasa en suero mayores que aquellos cuyo genotipo es  $\alpha\beta\beta\beta$  (13), basándose en la explicación de que la  $\alpha$ -triptasa es secretada de manera constitutiva.

En estos estudios se extrajo la conclusión de que la ausencia de cromosomas con dos alelos no funcionales combinada con la observación de que los humanos heredan menos de dos de estos alelos, da lugar a establecer la importancia potencial de la existencia de triptasas activas para la supervivencia. Esto se completa con la afirmación de que heredar menos de dos  $\beta$  triptasas es perjudicial y con el hecho de que la  $\alpha$ -triptasa no es esencial para la supervivencia.

### 1.5.3.~ REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL

Los mastocitos dependen de diferentes citocinas para la proliferación, diferenciación, maduración y supervivencia (111). Se ha llegado a la conclusión de que los mastocitos se valen de mecanismos de modificación transcripcionales y post-transcripcionales para alterar los niveles de expresión individual y que dicha expresión, al menos en triptasas de ratón, está regulada por el microambiente local (112). Dicha regulación está controlada positivamente por el factor de transcripción mi (MITF), descrito inicialmente para la mMCP-6 (proteasa del mastocito de ratón utilizada para el estudio de la triptasa humana) (113). Paralelamente, se han descrito otras proteínas que presentan una actividad sinérgica, es decir, cooperadora con la activación de dicha triptasa de ratón, como es el caso de proteínas PEB2 (*polyomavirus enhancer binding protein 2*) (114), MAZR (*myc-associated zinc-fingerproteinrelated factor*), que interacciona con el dominio ZIP de MITF, y c-jun. Esta transactivación se produce por unión de estos factores a regiones del promotor que responden a la secuencia CANNTG, localizados -100 a -200 pb en sentido 5'.

Como se ha comentado, el factor MITF es esencial para la expresión de los genes *mMCP-6*; éste se une a tres motivos en la región del promotor de este gen (113), estas regiones son parcialmente reconocidas por otros factores de transcripción, como PEBP2 (*polyomavirus enhancer-binding protein*), que interactúa con el anteriormente mencionado factor de transcripción del gen *mMCP-6* (114). De hecho, se considera que la formación del complejo MITF, PEBP2 y MAZ es posible, lo que haría más eficiente la transcripción del gen *mMCP-6* en mastocitos (115).

Se ha demostrado que la activina A y el factor de crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1) aumentan la expresión génica de *mMCP-7* en progenitores mastocitarios, lo cual está transcripcionalmente mediado por Smad3. Estas mismas proteínas dan lugar a un aumento de los niveles de transcripto del gen *TPSAB1* y descienden en presencia de MITF. El papel de MITF en este sistema puede ser inhibido por Smad3 (mediador de la transcripción) (116). Finalmente, MITF regula la expresión del gen *TMT* por unión a las dos E-boxes localizadas en la posición -1708 y -1805 (117). En resumen, MITF puede controlar los genes de proteasas del mastocito, regulación que puede tener lugar por contacto directo con los elementos del promotor o por interacción con otros factores de transcripción. Estos mismos estudios han probado, en mastocitos, en respuesta a la activación (118) y modulación de la migración y cambios morfológicos en progenitores mastocitarios (119), que la activina/TGF- $\beta$  regulan las funciones de los mastocitos como efectores celulares en el sistema inmune.

Estudios realizados por Jiang y cols (120) han demostrado que la triptasa estimula la expresión de factores de células madre (*stem*), lo que promueve la

acumulación de mastocitos en la reacción inflamatoria; la triptasa, además estimula la síntesis y liberación de IL-1 $\beta$  e IL-8, que induce la infiltración leucocitaria (87, 121); además, la triptasa, puede activar células mononucleares que producen y secretan IL-6 y TNF $\alpha$  (122), que inducen el desarrollo de la inflamación en el sistema vascular. Los resultados obtenidos indican que la inhibición de triptasa puede inhibir la expresión y secreción de IL-6 y TNF- $\alpha$  en células vasculares endoteliales. El descenso de la expresión de esta proteasa inducida por ARN de interferencia puede inhibir la inflamación vascular por descenso de los factores pro-inflamatorios.

## **1.6.~IMPORTANCIA DE LOS NIVELES DE TRIPTASA Y PATOLOGÍAS RELACIONADAS**

### **1.6.1.~ NIVELES DE TRIPTASA**

Como valor diagnóstico la triptasa es de gran importancia en determinadas entidades; así, sus niveles aumentan después de los episodios graves de anafilaxia o de reacciones anafilactoides y aparece permanentemente elevada en las mastocitosis (123, 124). La triptasa total puede ser medida entre los 15 minutos y las 3 horas después de los síntomas que sugieran anafilaxia, ya que el tiempo de vida media de esta proteasa es de 2 horas. De manera ideal ha de compararse con una muestra basal del suero (123). Estos niveles tienen correlación con los niveles de histamina en suero (4), que regresan a niveles basales a los 30 minutos; sin embargo, la triptasa permanece en suero más tiempo (5-6 horas) tras el episodio, lo que supone una diferencia sustancial con respecto a la histamina debido, en parte, a la diferente solubilidad de una y otra en plasma.



Debido al hecho de que en los gránulos de los mastocitos se almacenan grandes cantidades de  $\beta$ -triptasa se han desarrollado ensayos para valerse de la triptasa como marcador clínico de las enfermedades mediadas por mastocitos. Los ensayos iniciales consistían en inmunoensayos usando el anticuerpo de ratón G5 (selectivo de  $\beta$ -triptasa) o con anticuerpo G4 para una mayor sensibilidad, más tarde se alcanzó mayor sensibilidad con el anticuerpo B12 (125).

Los niveles basales de triptasa madura son normalmente indetectables ( $< 1$  ng/mL) en individuos sanos. Los niveles basales de triptasa oscilan entre 1 y 11,4  $\mu$ g/L con una media de 3 a 5  $\mu$ g/L.

**Tabla 5:** niveles de triptasa en suero según las distintas patologías. Tomado de Schwartz, 2011.

Condición clínica	Niveles de triptasa		Ratio triptasa total/triptasa madura
	Total	Madura	
Normal	1 a 11,4	$<1$	NA
Anafilaxis Sistémica (aguda)	$>$ basal	$>1^{**}$	$<10$
Mastocitosis Sistémica (no aguda)	$> 20^*$	$<1$	$>20$

NA: no aplicable

\*Reflejo de la carga de los gránulos de mastocitos cuando el individuo se encuentra en un estado no-anafiláctico. Un nivel basal de triptasa  $>11,4$   $\mu$ g/L aumentaría la posibilidad de una alteración mastocitaria clonal subyacente (ej. mastocitosis sistémica) o una alteración de la activación mastocitaria primaria.

\*\*Nivel relacionado con la gravedad clínica (hipotensión), toma de la muestra al comienzo de signos y síntomas y la naturaleza de los estímulos anafilácticos

En resumen, la triptasa es un marcador característico de los mastocitos y, cuando es detectada en suero o plasma indica que los mastocitos son participantes activos (126). En la tabla 5 se muestran los niveles de triptasa promedio para cada una de las distintas patologías que se detallan.

### **1.6.2.~ PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON LOS NIVELES ELEVADOS DE TRIPTASA**

En un intento de relacionar los niveles de triptasa con las distintas patologías en las que esta enzima se ve implicada, como reacciones alérgicas o asma, se demostró que no existe correlación entre el asma, la rinitis o reactividad derivada de la inhalación de alérgenos con los niveles de triptasa; sí existe, por el contrario, con la edad, el sexo masculino, el índice de masa corporal, el hábito tabáquico y el consumo de alcohol, que muestran una relación inversamente proporcional con los niveles de triptasa (127).

Otros estudios han demostrado que el haplotipo  $\alpha\beta$  triptasa y el sexo femenino están asociados con una pequeña, pero estadísticamente significativa, elevación de los niveles de triptasa circulante en individuos sanos (128). Pero, por el contrario, la carencia de la forma  $\alpha$  no parece estar relacionado con la gravedad de la enfermedad o los niveles de triptasa total (106).

Existen distintas patologías que cursan con triptasa elevada. Los niveles elevados de triptasa completamente procesada o total en suero deben servir, a menudo, para distinguir la anafilaxia de otras condiciones patológicas. De manera general, se sabe que un aumento de la triptasa madura en suero indica que ha tenido lugar la activación de mastocitos (y, posiblemente, basófilos).

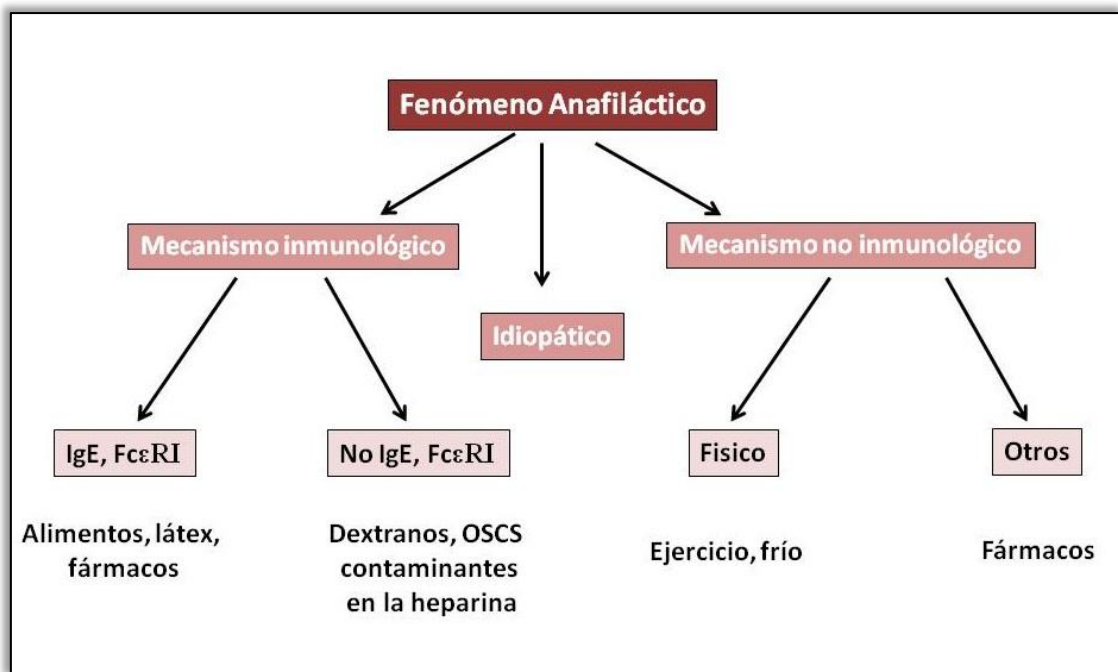
En un **proceso anafiláctico**, episodio agudo resultante de una reacción alérgica sistémica potencialmente mortal, mediada por fenómenos inmunológicos o no inmunológicos, los niveles de triptasa madura ( $\beta$ -triptasa) pueden elevarse enormemente en comparación con los niveles basales con la suficiente gravedad como para derivar en hipotensión (126). La mortalidad en estos casos es del 0,5% al 2% (129), pero bien es cierto que es un fenómeno mal diagnosticado, en ocasiones no informado y/o desconocido [Simons, 2010 #307] y que afecta generalmente a gente joven (131, 132).

La patogénesis que subyace en este fenómeno generalmente se debe a mecanismos inmunológicos en los que se sintetiza la IgE en respuesta a la exposición a un alérgeno y ésta se une a los receptores de alta afinidad de IgE (Fc $\epsilon$ RI) de la superficie de las membranas de mastocitos y basófilos (133), desgranulándolos al contacto con el alérgeno. Por otra parte, se sabe, que la IgE contribuye a intensificar la anafilaxia porque facilita la expresión de Fc $\epsilon$ RI en mastocitos y basófilos (134-136). En ocasiones, otros mecanismos inmunológicos en los que no está implicada la IgE son responsables de fenómenos anafilácticos (137).

En el esquema se refleja los mecanismos principales que subyacen en los fenómenos anafilácticos descritos en humanos (figura 13).

En ocasiones, se han recogido casos en los que las causas del fenómeno anafiláctico no han sido vislumbrados y cuyos niveles de triptasa madura permanecen elevados (110 ng/mL) durante aproximadamente 26 horas después de los síntomas (138).

En individuos que no sufren fenómenos anafilácticos los niveles de la triptasa total están integrados también por protriptasas inmaduras y reflejan, en parte, la carga total de los gránulos de los mastocitos. Estos son pacientes diagnosticados de **mastocitosis sistémica**, una alteración mastocitaria clonal que está asociada con hiperplasia en lesiones cutáneas, hígado, nódulos linfáticos y médula ósea (139), de modo que este grupo de patologías cursan con acúmulos de mastocitos en las regiones indicadas (140). En esta patología, la triptasa total está claramente elevada (>20 ng/mL), lo que para la OMS (Organización Mundial de la Salud) constituye un criterio diagnóstico principal. La ratio entre la triptasa total y la completamente procesada es generalmente superior a 20.



**Figura 13.** Mecanismos subyacentes a la anafilaxia [Simons, 2010 #307]

En esta patología se han detectado mutaciones somáticas responsables de la activación de la molécula *c-kit* (receptor del factor formador de colonias, SCF; indispensable para la proliferación, activación y diferenciación de estas células) (141) y la aparición de formas aberrantes de los mastocitos (142).

De forma general, se pueden describir tres tipos de manifestaciones clínicas en esta patología: las que son consecuencia de la liberación masiva de la carga mastocitaria, las derivadas de manera secundaria de esta liberación y las resultantes de la infiltración en distintos tejidos. Sin embargo, no siempre puede establecerse una relación entre la cantidad de mastocitos y los síntomas de esta liberación (143), de modo que algunos pacientes permanecen asintomáticos y otros, con un diagnóstico equivalente y misma carga mastocitaria, padecen síntomas graves.

**Tabla 6:** criterios propuestos para el diagnóstico de SAM(144)

	<b>Criterios propuestos</b>
<b>1</b>	Síntomas episódicos consistentes con la liberación de mediadores mastocitarios que afectan a 2 o más sistemas orgánicos: <ul style="list-style-type: none"> <li>a) Piel: urticaria, angioedema, rubor</li> <li>b) Gastrointestinal: náuseas, vómitos, diarrea, calambres abdominales</li> <li>c) Cardiovascular: síncope hipotensivo, taquicardia</li> <li>d) Respiratorio: jadeo</li> <li>e) Naso-ocular: inyección conjuntival, prurito, falta de ventilación</li> </ul>
<b>2</b>	Descenso en la frecuencia o gravedad o resolución de los síntomas con terapia de antimedidores: H1 y H2-agonistas, antileucotrienos o estabilizadores de mastocitos.
<b>3</b>	Aumento de marcadores de activación mastocitaria en suero u orina durante el episodio agudo.
<b>4</b>	Descartadas causas primarias y secundarias de activación mastocitaria y clínicas idiopáticas bien definidas.

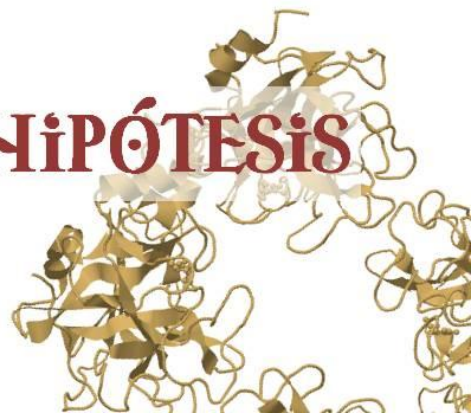
Recientemente, se ha descrito el Síndrome de Activación Mastocitaria (SAM), definido por la aparición de síntomas diversos, cutáneos, gastrointestinales

y cardiovasculares, entre otros (tabla 6) (145), en pacientes en los que se han descartado causas primarias o secundarias de activación mastocitaria o entidades idiopáticas bien definidas (146). Los pacientes con este síndrome deben cumplir al menos tres de los cuatro criterios reflejados en la tabla 6.

Por tanto, los niveles elevados de triptasa pueden reflejar un aumento de la carga de los gránulos de los mastocitos, aumento de la producción y liberación de triptasa por parte de estas células o una producción aberrante de la proteína (147), pero en todo caso implican la necesidad de realizar un análisis clínico y diagnóstico completo de los pacientes que presentan esta característica.



# HiPÓTESiS







## 2~ HIPÓTESIS

Las implicaciones de la triptasa en los procesos alérgicos y en la etiopatogenia del asma hacen de esta enzima una posible diana farmacológica. Nuestra hipótesis de trabajo se basa en que determinadas diferencias en la secuencia génica pueden afectar el nivel de triptasa y su función.

Además, la identificación de dichas modificaciones podría explicar el mecanismo por el cual se producirían cambios en la expresión de triptasa y su relación con fenotípicos específicos.

## HYPOTHESIS

Tryptase is involved in allergic process and in the pathogenic mechanisms of asthma, for this reason it could be a putative pharmacologic target. Our main hypothesis is based on that variation in the genetic sequence of tryptase could affect tryptase levels and function.

Therefore, the identification of such modifications could help to explain the mechanisms by which changes in the expression of the tryptase occur and the relationship with specific phenotypes.



# OBJETIVOS





### 3- OBJETIVOS

- 1- Analizar las regiones polimórficas del gen *TPSAB1* en la población de pacientes alérgicos y en controles.
- 2- Determinar las distribuciones alélicas y genóticas y establecer las combinaciones haplotípicas de las variantes génicas.
- 3- Evaluar la relación entre los parámetros clínicos y biológicos y la presencia de la forma  $\alpha$  de la triptasa.
- 4- Determinar las variantes génicas características de pacientes con niveles elevados de triptasa con relación familiar.
- 5- Analizar la expresión génica y su relación con los niveles de triptasa en suero en esos pacientes.
- 6- Predecir el posible efecto de las variantes génicas en el fenotipo de pacientes con niveles elevados de triptasa.

## OBJECTIVES

- 1- To analyze the polymorphic regions of the *TPSAB1* gene in a population of allergic patients and in controls.
- 2- To determine genotypic and allelic distributions in the sample and to establish the haplotype combinations of the genetic variants.
- 3- To evaluate the relationship between clinical and biological parameters and the  $\alpha$  tryptase form.
- 4- To determine genetic variants of patients with high tryptase levels with a familiar relationship.
- 5- To analyze the gene expression and the relation to the serum level of tryptase in these patients.
- 6- To predict the putative effect of genetic variants in the phenotype of patients with high level of tryptase.

# MATERiAL Y MÉTODOS







## **4~ MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1.~ INDIVIDUOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO**

#### **4.1.1.~ PACIENTE PROPÓSITO DE ESTUDIO**

El primero de los individuos incluidos en el estudio fue una paciente con triptasa elevada que refería la siguiente historia clínica, tomada literalmente:

“Mujer de 56 años que ha requerido cuatro ingresos por presentar cuadros similares entre los años 2001 y 2003, en los que, según la historia clínica, “encontrándose previamente asintomática (salvo dudoso malestar general y distensión abdominal en los dos o tres días previos) refiere la aparición brusca y sin desencadenante de escalofríos, abdominalgia intensa (epigástrico irradiado a espalda, hipocondrio derecho), despeño diarreico (heces de características normales sin productos patológicos), náuseas intensas seguidas de vómitos (espumosos y bilis en abundante cuantía) y sensación de mareo (sin pérdida de conciencia, aunque a su llegada a urgencias presentaba somnolencia) y calambres en miembros. Es trasladada a urgencias por el 061 recibiendo tratamiento con atropina por bradicardia sinusal y pausa de entre 5 y 10 segundos. En urgencias sufre deterioro progresivo de su estado general, con vómitos muy abundantes, hipotermia (< 35 °C), abdominalgia intensa sin respuesta a analgesia, pupilas puntiformes reactivas sin focalidad neurológica, calambres en miembros y, en la analítica, alcalosis respiratoria con hipopotasemia (K: 2,9 mEq/L en tratamiento con KCl) por lo que se decide su traslado a UVI. Durante su ingreso presenta evolución

muy favorable, sin deterioro del nivel de conciencia, inestabilidad hemodinámica o compromiso respiratorio, por lo que dada su buena situación clínica y analítica se decide su alta”.

La exploración física resultó normal sin encontrar adenopatías ni ingurgitación yugular, los ruidos cardiacos son rítmicos a 70 latidos por minuto, sin soplos, y a la auscultación pulmonar presentaba murmullo vesicular conservado. El abdomen era blando, no doloroso, sin masas ni visceromegalias, con ruidos hidroaéreos conservados, aunque disminuidos. Respecto a las extremidades, los pulsos distales eran normales y no se observaban signos de trombosis venosa profunda, ni edemas. La exploración neurológica era normal.

Los cuadros no se acompañaban de lesiones cutáneas, de angioedema ni de otras manifestaciones cutáneas, tampoco refería antecedentes familiares con este tipo de sintomatología. Entre sus antecedentes personales cabe destacar que ha sido colecistectomizada, y presenta múltiples quistes hepáticos y diverticulosis de colon.

Los cuadros no se pudieron relacionar con la ingestión de ningún tipo de alimento, medicamento, manipulación dental ni otro tipo de desencadenante. Se descartó patología tiroidea, suprarrenal, tumor carcinoide, tumores neuroendocrinos, enfermedad celíaca, patología autoinmunitaria e incluso una porfiria aguda intermitente.

Con todos estos antecedentes y estudios negativos que habían descartado los procesos anteriormente indicados, se consideró la necesidad de derivarla al Servicio de Alergia para su evaluación. En este Servicio se le realizó una batería de

pruebas intraepidérmicas con una batería de aeroalérgenos comunes, cuyo resultado fue negativo; así como con una batería de alimentos que incluía leche, huevo y sus respectivas proteínas, frutos secos, leguminosas y pescados, con resultado igualmente negativo. La IgE sérica total fue de 21,6 kU/L, y la determinación de IgE específica frente a *Ascaris lumbricoides*, *Echinococcus granulosus*, *Anisakis simplex* y látex resultó también negativa. La serología a *Fasciola* resultó negativa. El estudio del complemento (C3, C4, CH100 y C1INH) fue normal. **La triptasa sérica basal fue de 47,4 mcg/ml.**

Se le prescribió entonces desloratadina, 5 mg en dosis única diaria. Este medicamento, de naturaleza antihistamínica, descrito como un antagonista selectivo de receptores de histamina H<sub>1</sub> periféricos, de acción prolongada y no sedante, se utiliza con el fin de paliar la intensidad de los síntomas derivados de la liberación de mediadores mastocitarios, en concreto histamina (148).

A lo largo de la evolución, se repitió en varias ocasiones la determinación de triptasa tanto basal como coincidiendo con dos reagudizaciones. En general, cabe destacar que los niveles de triptasa se mantuvieron elevados, sin que se incrementasen durante las reagudizaciones. Los resultados se presentan en tabla 7 en la que consta la fecha de determinación de los niveles de triptasa y su concentración en suero.

Ante la persistencia de valores elevados de triptasa basal y aunque la clínica que presentaba la paciente no fuera característica, se decidió descartar una mastocitosis sistémica (140, 149).

Se siguió el siguiente algoritmo para el estudio de la mastocitosis del adulto una vez realizado un estudio completo de alergia (149) (figura 14).

Se procedió entonces a realizar una biopsia de médula ósea, con administración previa de premedicación, según las recomendaciones establecidas.

**Tabla 7:** Relación de los niveles de triptasa determinados en la paciente y las fechas en que fueron realizadas las pruebas. A: niveles de triptasa en reagudización del cuadro clínico

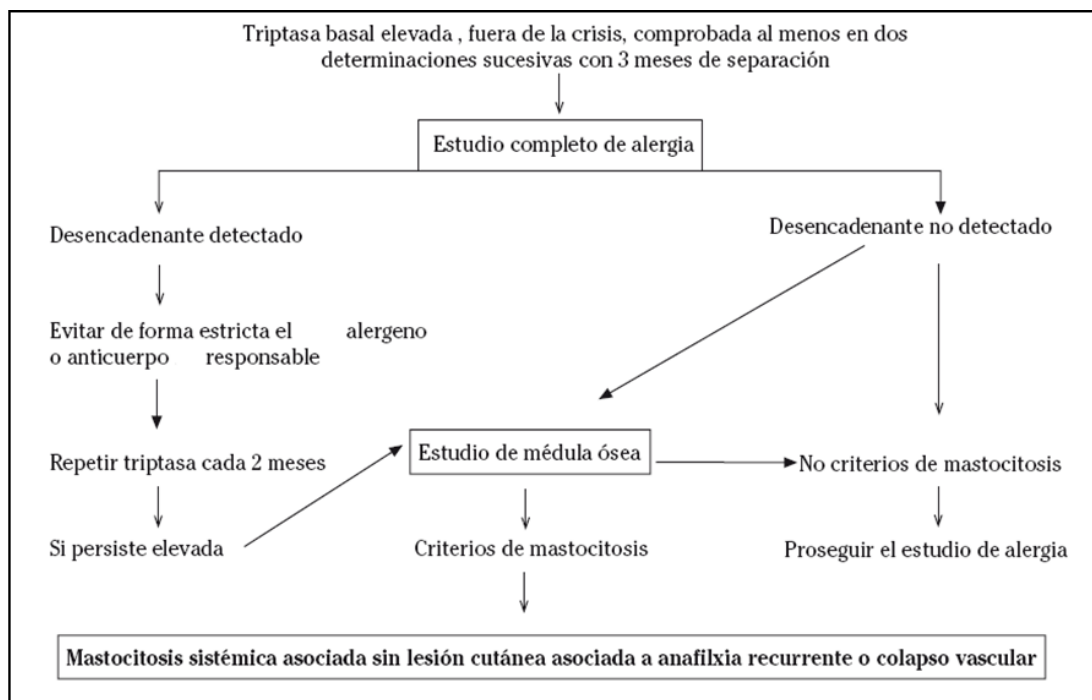
Fecha	Concentración (µg/L)*
19/11/2002	47,4
10/01/2003	48,4
31/01/2003	35,9 <sub>A1</sub>
03/02/2003	44,4 <sub>A2</sub>
28/04/2003	59,9
13/01/2004	56,2
30/01/2004	62,2
05/02/2004	55,2
03/05/2004	49,3
03/05/2004	35,0
15/02/2005	51,8
03/05/2005	46,4
06/05/2005	43,3
31/07/2005	35,4
19/03/2008	50,2
12/11/2012	53,0
19/12/2012	44,5

**A1:** a las 16 horas, **A2:** a las 21 horas después del episodio agudo

\*Rango de normalidad para los niveles de triptasa: 1-11,4 µg/L en sujetos sanos (128)

La biopsia de la cresta ílfaca de médula ósea consistió en un cilindro óseo artefactado, que presentaba hiperplasia eritroide relativa, con la serie blanca y los megacariocitos sin presentar alteraciones significativas. En algunas celdillas se

advertía un discreto infiltrado linfocitario intersticial de aspecto reactivo. De esta manera no pudieron observarse alteraciones significativas y no se confirmó la existencia de la enfermedad al carecer de un aumento en número de mastocitos, con tamaño aberrante o formando agregados (150). El inmunofenotipo aberrante descrito actualmente para los mastocitos se basa en la expresión de CD25, CD2 y niveles anormalmente elevados de CD11c y receptores CD35 del complemento, de molécula CD59, reguladora del complemento, antígeno de membrana lisosomal CD63, y CD69 de activación temprana del antígeno; además de niveles excepcionalmente bajos de CD117 (151). La biopsia de médula ósea fue bien tolerada.



**Figura 14.** Algoritmo diagnóstico en la mastocitosis del adulto en paciente sin lesión cutánea y con cuadros recurrentes de anafilaxia o colapso vascular. De la Hoz y cols (149).

El informe remitido por el servicio de citometría de la Universidad de Salamanca detallaba que los mastocitos encontrados en la muestra obtenida de la punción de médula ósea no superaban el 0,006% y su número inferiores a una por cada 100.000 células en sangre periférica. Estos mastocitos (CD117++/CD45+) presentaban un fenotipo normal (CD25-, CD2-, CD69+ débil, IgE+). El informe concluía que “el estudio fenotípico es compatible con presencia de mastocitos normales en médula ósea y descartándose infiltración de médula ósea por mastocitosis sistémica”.

La paciente no mejoró con tratamiento continuado con antihistamínicos H1, esteroides y cromoglicato oral.

#### **4.1.2.~ HERMANA, MARIDO E HIJAS DE LA PACIENTE**

Ante la ausencia de un diagnóstico claro, se decidió realizar una determinación de triptasa basal a dos **hijas** y una **hermana** de la paciente (todas ellas asintomáticas), pensado los clínicos en un aumento de los niveles de triptasa de posible origen familiar. Además se incluyó al **marido** para analizar la segregación de cualquier posible variante de las hijas.

Se analizaron los niveles de triptasa de las dos hijas (30,5 y 28,9 µg/L) y de la hermana de la paciente (46,0 µg/L), Se les realizó, previo consentimiento informado, una extracción para la recogida del ADN y al marido y a la hermana de la paciente se le realizó, además, extracción de ARN. También fueron analizados los niveles de triptasa del marido de la paciente, que fueron de 4,22 µg/L. También otorgó su consentimiento informado para la realización de estudios genéticos.

### **4.1.3.~ PACIENTES CON ENFERMEDADES ALÉRGICAS**

Con el fin de contrastar los hallazgos obtenidos del análisis molecular del gen *TPSAB1* en pacientes con triptasa elevada respecto a pacientes alérgicos, en este trabajo se incluyeron además un total de 167 pacientes que cumplían los siguientes criterios:

- Pruebas cutáneas positivas para alguno de los alérgenos incluidos en una batería de aeroalérgenos comunes en nuestro medio.
- Diagnóstico médico de asma de origen alérgico.

Los datos clínico-biológicos de los pacientes se recogieron mediante un protocolo estructurado, obteniéndose a partir de las historias clínicas, de una exploración directa de los pacientes y de una anamnesis detallada. Todos los pacientes provenían del Servicio de Inmunoalergia del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca y tenían el diagnóstico realizado por los facultativos de dicho Servicio, de acuerdo con la práctica habitual. Todos los pacientes habían otorgado su consentimiento informado por escrito.

### **4.1.4.~ CONTROLES**

Con el fin de comparar todos los resultados obtenidos en los grupos anteriores se incluyó un último grupo control constituido por un total de 135 individuos que acudieron al Servicio de Inmunoalergia del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca que dieron su consentimiento informado y que cumplían estrictos criterios de selección:



- Edad superior a 18 años.
- Ausencia de síntomas y antecedentes de asma y otras enfermedades respiratorias.
- Ausencia de síntomas y antecedentes de alergia.
- Pruebas cutáneas negativas con la misma batería de aeroalérgenos.
- Ausencia de antecedentes familiares de primer grado de asma, rinitis alérgica o atopia.
- Niveles de triptasa inferiores a 11,4 µg/L

## **4.2.~ DATOS DEL ESTUDIO**

### **4.2.1.~ DATOS DE FILIACIÓN**

Se recogieron los datos de filiación de los individuos, que sólo se emplearon en la identificación inicial del paciente, pero no se utilizaron en el estudio y análisis, que se realizó respetando el anonimato del paciente. Se registraron la edad, el sexo y la fecha de nacimiento, Anexo I.

### **4.2.2.~ DATOS CLÍNICOS Y ANALÍTICOS**

#### ***A~ DIAGNÓSTICO DE ASMA***

La presencia de asma fue diagnosticada por los facultativos con los siguientes criterios:

- Al menos dos síntomas consistentes con asma (tos, disnea, sibilancias, opresión torácica).

- Ausencia de otras enfermedades pulmonares.
- Alteraciones en la función pulmonar: se realizó una espirometría basal según las normas de la American Thoracic Society (ATS) (152). A todos los pacientes con  $FEV_1/FVC < 0,7$  se les realizó una prueba de broncodilatación; si ésta fue negativa, se procedió a realizar una prueba de hiperreactividad bronquial con metacolina (153). Se exigió una prueba broncodilatadora positiva (mejoría del  $FEV_1 > 12\%$  y más de 200 mL) o una  $PC_{20}$  metacolina  $< 16$  mg/mL, considerándose su positividad, en presencia de los datos clínicos anteriormente citados, característica de asma.

### **Gravedad del asma**

La gravedad de asma se determinó en los pacientes, clasificados en una de las cuatro categorías establecidas por la GINA (*Global Initiative for Asthma*) (154); si el paciente estaba recibiendo tratamiento se utilizó la clasificación adaptada:

#### **a) Asma intermitente:**

- Aparición de síntomas con una frecuencia menor de una vez por semana.
- Crisis de corta duración.
- Síntomas nocturnos con una frecuencia menor de dos veces al mes.
- $FEV_1$  o PEF  $\geq 80\%$ .
- Variabilidad del PEF o  $FEV_1 < 20\%$ .

**b) Asma persistente leve:**

- Aparición de síntomas más de una vez a la semana pero no diariamente.
- Episodios nocturnos más de dos veces al mes.
- $FEV_1$  o PEF  $\geq 80\%$ .
- Variabilidad del PEF o  $FEV_1 < 20\% - 30\%$ .

**c) Asma persistente moderada:**

- Síntomas diarios.
- Las crisis pueden afectar la actividad diaria y el sueño.
- Uso diario de  $\beta$ -2 agonistas inhalados.
- $FEV_1$  o PEF 60-80%.
- Variabilidad del PEF o  $FEV_1 > 30\%$ .

**d) Asma persistente grave:**

- Síntomas diarios.
- Crisis frecuentes.
- Episodios asmáticos nocturnos frecuentes.
- Limitación en las actividades físicas.
- $FEV_1$  o PEF  $< 60\%$ .

- Variabilidad del FEV<sub>1</sub> o PEF > 30%.

### ***B~ DIAGNÓSTICO DE ALERGIÀ***

Para determinar si se trataba de un paciente con atopia o no, se realizaron pruebas cutáneas y determinación de IgE además, se determinaron los niveles de triptasa.

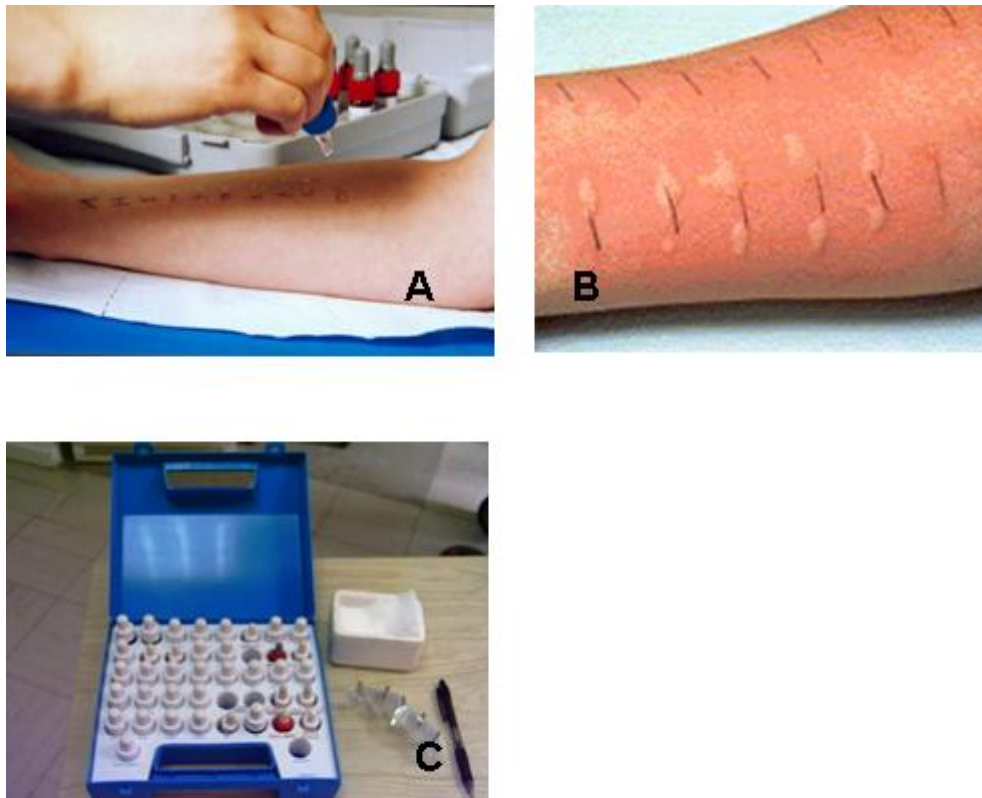
#### **Pruebas cutáneas**

Las pruebas intraepidérmicas (*prick*) se realizaron de acuerdo con las recomendaciones de la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica – EAACI - (155) con una batería de aeroalérgenos adaptada a la exposición local (ALK-Abelló, Madrid; Bial-Aristegui, Bilbao; CBF-Leti, Barcelona), que incluía *Dermatophagoides pteronissynuss*, *D. farinae*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Acarus siro*, *Euroglyphus maynei*, mezcla de gramíneas, mezcla de árboles, *Parietaria judaica*, *Chenopodium album*, *Artemisia vulgaris*, *Plantago lanceolata*, *Olea europaea*, *Cupressus sempervirens*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus fumigatus*, y epitelios de perro, gato, hámster, caballo y conejo, así como los correspondientes controles negativo (suero fisiológico) y positivo (dihidrocloruro de histamina, 10 mg/ml; ALK-Abelló, Madrid; CBF-Leti, Barcelona). En la figura 15 se reflejan cómo se elabora la prueba intraepidérmica, el resultado de las pruebas positivas y la batería de aeroalérgenos utilizada.

#### **Determinación de IgE**

Se determinó mediante enzimoimmunoanálisis siguiendo las recomendaciones del fabricante (Phadia InmunoCAP 250, Uppsala, Suecia) en

muestras de suero de los pacientes. El ImmunoCAP Total IgE es una prueba *in vitro* para la cuantificación de IgE total circulante en muestras de suero humano.



**Figura 15.** **A:** realización de pruebas cutáneas intraepidérmicas. **B:** resultado positivo de las mismas. **C:** batería de aeroalérgenos más habitual

La técnica se fundamenta en un fluoroenzimoinmunoanálisis, de tal manera que los anticuerpos anti-IgE unidos covalentemente a los *ImmunoCAP*, reaccionan con la IgE específica del suero del paciente. Se añade una enzima unida a anticuerpos anti-IgE ( $\beta$ -galactosidasa-anti-IgE, anticuerpos monoclonales de ratón, 2  $\mu$ l/ml) formándose un complejo con la IgE del suero. Después de la incubación las enzimas no unidas son eliminadas mediante un lavado y el complejo final es

posteriormente incubado con la solución de desarrollo. Después de detener la reacción se mide la fluorescencia del eluído. Para evaluar los resultados de las pruebas, las unidades de respuesta se transforman en concentraciones utilizando la curva de calibración que ha sido obtenida al procesarse un calibrador por duplicado

Para la **recogida y manejo de la muestra** se utilizaron muestras de suero de una punción de sangre venosa. La extracción de sangre debía seguir los procedimientos estándar.

### **Determinación de triptasa**

La cuantificación inicial de los niveles de triptasa en suero se realizó mediante un enzimoimmunoanálisis (Phadia InmunoCAP 250, Uppsala, Sweden), técnica de rutina en el Laboratorio del Servicio de Inmunoalergia del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

Para la **recogida y manejo de la muestra** la determinación de triptasa se realizó a partir de muestras de suero recogidas en tubos sin anticoagulante, de una punción antecubital de sangre venosa. Las muestras se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su análisis posterior. Se realizaron alícuotas para evitar congelaciones y descongelaciones sucesivas.

El fundamento de la técnica se basa en que la anti-triptasa, unida covalentemente al InmunoCAP, reacciona con la triptasa de la muestra de la paciente. Después de un lavado, se añaden anticuerpos ligados a la enzima, formándose un complejo. Tras la incubación, el complejo final es incubado y una vez parada la reacción se mide la fluorescencia del eluido.

En el caso de los episodios agudos, se siguieron las indicaciones del fabricante: se obtuvieron las muestras entre 15 minutos y 3 horas después del inicio del episodio desencadenante de la activación mastocitaria. Para confirmar el retorno a los niveles basales, se obtuvo una muestra de sangre adicional después de al menos 24-48 horas, dependiendo el tiempo de la magnitud de activación. Si se sospechaba de la existencia de niveles basales elevados o de mastocitosis subyacente, se obtuvieron una o varias muestras adicionales entre 1 y 2 semanas más tarde o con un lapso temporal superior.

### **4.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA EL ESTUDIO MOLECULAR**

#### **4.3.1.~ EXTRACCIÓN DEL ADN**

Se realizó una extracción de ADN en sangre periférica recogida en tubos con anticoagulante EDTA mediante un sistema automatizado (MagNA Pure Compact, Roche, Indianapolis, IN, USA). La cuantificación y pureza del DNA extraído se determinó mediante Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA.).

El *MagNA Pure Compact* (Roche) es un robot diseñado para la preparación automática de ácidos nucleicos a partir de una amplia variedad de muestras (por ejemplo, sangre de mamífero, suero, plasma, células sanguíneas, células procedentes de tejido, tejidos) por medio de los reactivos (*MagNA Pure Compact reagent kits*) diseñados para el mismo, de modo que es capaz de procesar 8 muestras en un tiempo de 48 minutos. Se trata de una estación de trabajo automatizada que puede aislar automáticamente ácidos nucleicos a partir de una

muestra sin que se requiera un procesamiento previo. Además tiene integrado un ordenador con una consola táctil. La unidad central es un brazo robótico con 8 entradas para las puntas de pipeta que se incluirán en cada proceso. Estas pipetas pueden procesar de 1 a 8 muestras por proceso. Además, éstas tienen un sensor especializado que puede detectar coágulos en la muestra de partida.

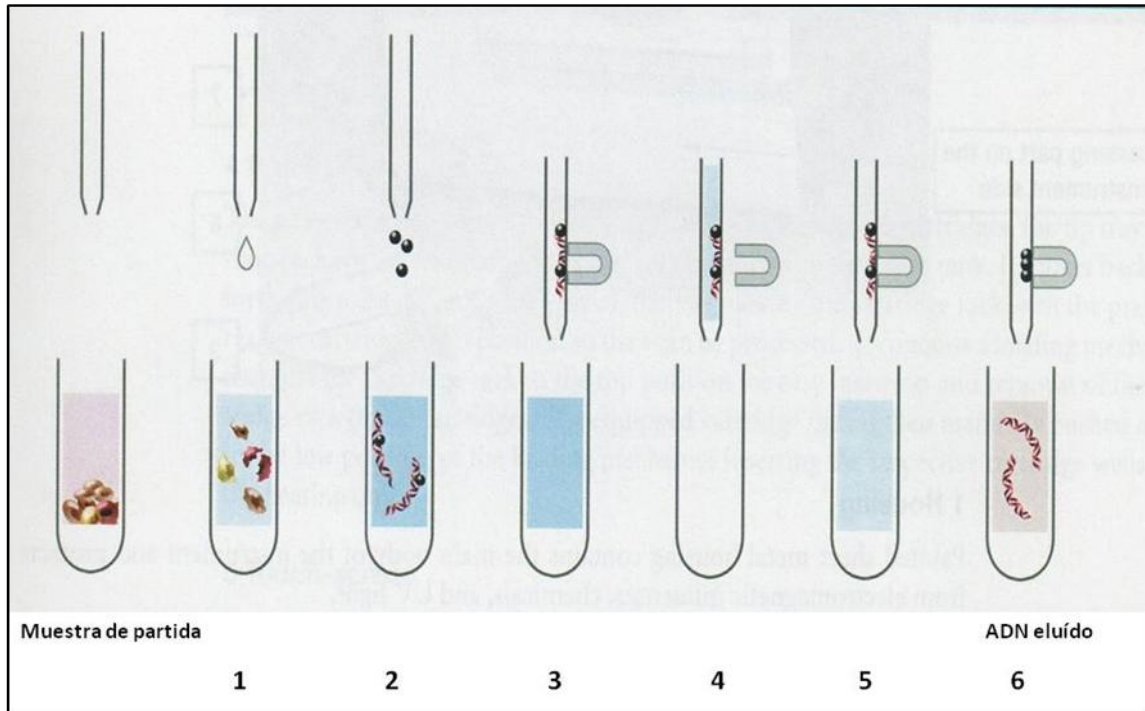
Cuando se lleva a cabo la purificación en el mencionado sistema automatizado los pasos que tienen lugar son los siguientes, que se reflejan en la figura 16:

- 1) Rotura celular y digestión proteica por la adición del *buffer* de lisis y proteinasa K.
- 2) Unión del ADN a la superficie de las partículas de vidrio magnéticas
- 3) Separación magnética del complejo ADN-bola magnética.
- 4) Eliminación de los restos celulares por sucesivos pasos de lavado.
- 5) Separación magnética del complejo bola- ADN
- 6) Elución del ADN a elevadas temperaturas mientras que tiene lugar la eliminación de las partículas de vidrio magnéticas.

La extracción se realizó siguiendo un protocolo en el que las muestras de 950  $\mu\text{L}$  de sangre total se disponían, previamente marcadas, en la gradilla indicada para tal fin en el robot. Para ello, era necesario introducir los cartuchos de reactivos con ayuda del lector de código de barras en el *rack*, indicar el protocolo a seguir (*DNA Blood Large Volume*), disponer las puntas que realizarán los lavados, y los tubos de



elución final previa lectura del código de barras tal y como indica el robot. El volumen de elución final de la muestra de ADN fue de 200  $\mu$ L.



**Figura 16.** Fundamento del procedimiento llevado a cabo por el MagNA Pure Compact (Roche) tomado del MagNA Pure Compact Operator's Manual.

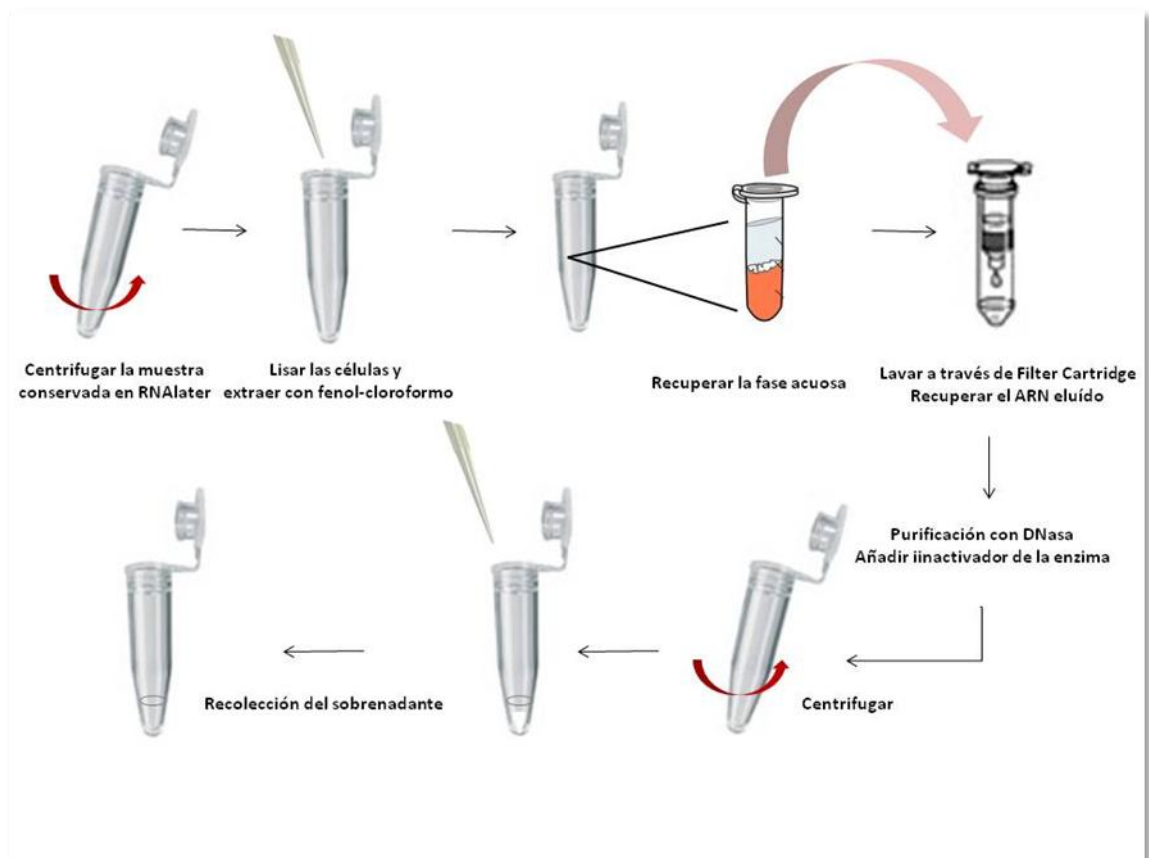
### 4.3.2.~ EXTRACCIÓN DEL ARN

Para la obtención del ARN se procedió al almacenaje de la muestra de sangre periférica obtenida por punción venosa en tubo con anticoagulante EDTA a  $-20^{\circ}\text{C}$  con el conservante RNeasy (Life Technologies<sup>TM</sup>, Calsbad, California, USA) en una proporción sangre/conservante de 400  $\mu$ L/ 1300  $\mu$ L.

El kit utilizado para la extracción fue el RiboPure<sup>TM</sup>-Blood Kit (Ambion, Life Technologies, Calsbad, California, USA) que permite el aislamiento de ARN total de

alta calidad a partir de sangre total no coagulada. Este protocolo de aislamiento de ARN consiste en dos partes:

- 1) Lisis celular en una solución basada en guanidina y una purificación inicial de ARN por extracción de fenol/cloroformo.
- 2) Purificación final de ARN por extracción en fase sólida en un filtro de fibra de vidrio.



**Figura 17.** Procedimiento de extracción y purificación de ARN seguido con el *kit RiboPure-Blood* (Ambion)

El kit permite evitar las contaminaciones con DNA genómico mediante la utilización de reactivos libres de DNA y la realización de un tratamiento con DNAsa, que es posteriormente eliminada mediante un procedimiento de inactivación y precipitación. Los pasos seguidos en la extracción se resumen en la figura 17.

#### **4.4.~ ESTUDIO MOLECULAR DE *TPSAB1***

##### **4.4.1.~ PCR**

La amplificación mediante PCR de las secuencias de DNA correspondientes a las regiones promotora y codificante del gen *TPSAB1* se llevó a cabo utilizando el sistema *PCR-Master Mix* (Promega, Madison, Wisconsin). Cada reacción fue preparada añadiendo 12,5  $\mu$ L de *Mastermix* (22mM Tris-HCl, pH 8.4, 55 mM KCl, 1.65mM MgCl<sub>2</sub>, 220 $\mu$ M dNTPs, 22U *Taq* ADN polimerasa), 4  $\mu$ L de ADN y 1  $\mu$ L de cada oligonucleótido. El volumen final de reacción fue en todos los casos de 26  $\mu$ L y en cada tanda de reacciones se incluyó una reacción sin ADN como control negativo para monitorizar las posibles contaminaciones. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador de MWG-BIOTECH (Eurofins, Ebersberg, Germany).

Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR fueron los descritos por Guida et al (156) y se detallan en la tabla 8. Todos ellos fueron suministrados de forma liofilizada (Roche, Penzberg, Germany) siendo reconstituidos a una concentración de 20  $\mu$ M con agua estéril libre de nucleasas (Promega, Madison, Wisconsin) y se conservaron a -20°C. En la siguiente figura se detalla las regiones de anillamiento de los oligonucleótidos utilizados (figura 18).

El programa utilizado para la amplificación de los fragmentos del gen mediante los *primers* 1TPS123FyR (TPS1 exón 1, 2 y 3), 1TPS34primaryF (TPS1 exón 3 y 4 primary PCR) F y R y 1TPS256F y R (TPS1 y 2 exón 5 y 6) del gen *TPSAB1* se detalla a continuación:

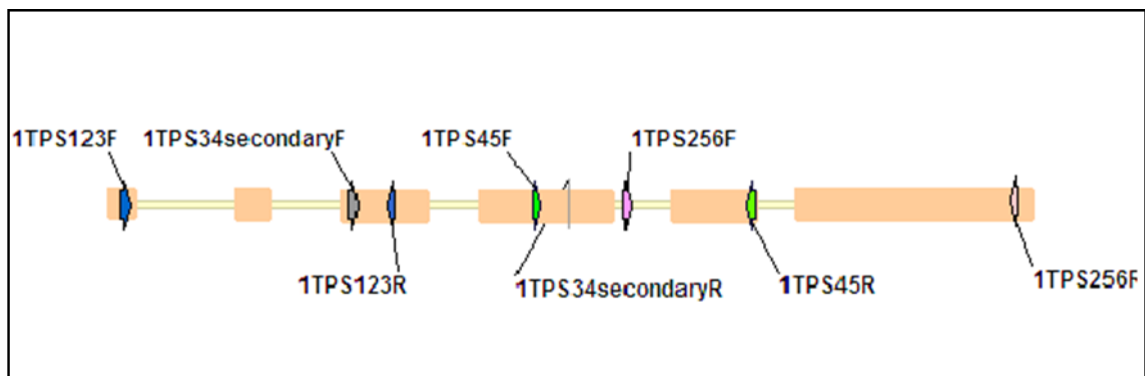
- 95°C, 10 minutos (1 ciclo)
- 95°C, 30 segundos;
- 60°C, 45 segundos; (35 ciclos)
- 72°C, 2 minutos
- 72°C, 5 minutos (1 ciclo).

**Tabla 8:** Denominación y secuencia de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR

DENOMINACIÓN	SECUENCIA
1TPS123F	5'-TGGGTAGAAGGAACAGGGA-3'
1TPS123R	5'-GTGCTGGGTATGACCTACG-3'
1TPS34primaryF	5'-CACATTCCACAGGTCAGG-3'
1TPS34primaryR	5'-TGTCCGGTCCGGGA-3'
1TPS34secondaryF	5'-CCAGCAGCGAGTAGGC-3'
1TPS34secondaryR	5'-TGTGCCAGTGGGACG-3'
1TPS45F	5'-TACACCGCCCAGATCG-3'
1TPS45R	5'-CCTCCCTGAGTACGCTC-3'
1TPS256F	5'-GGGGACAGGGTCTTAGC-3'
1TPS256R	5'-CGATTAGGAGGACTCACG-3'

En el caso del fragmento del gen en el que se utilizaron los oligonucleótidos 1TPS45 F y R (TPS1 exón 4 y 5) el programa que se utilizó fue el siguiente:

- 95°C, 10 minutos (1 ciclo)
- 95°C, 30 segundos;
- 60°C, 45 segundos; (40 ciclos)
- 72°C, 2 minutos
- 72°C, 5 minutos (1 ciclo).



**Figura 18.** Representación esquemática de las regiones de anillamiento en el gen *TPSAB1* para los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR. Las cajas de color naranja se representan los exones y las líneas de color pálido representan los intrones.

El último de los programas utilizados para la PCR secundaria en la amplificación del fragmento que comprende los exones 3 y 4 y el intrón 4 (oligos denominados 1TPS34 secondary F y R) fue:

- 95°C, 10 minutos
- 95°C, 30 segundos;
- 72° (menos 1° por ciclo), 30 segundos, (7 ciclos)
- 65°C, 45 segundos;
- 72°C, 2 minutos.
- 72°C, 5 minutos.

La amplificación del DNA de la **región promotora** del gen *TPSAB1* mediante PCR se llevó a cabo utilizando el mismo sistema *PCR-Master Mix* (Promega, Madison, Wisconsin) indicado anteriormente.

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados gracias a la plataforma online *primer3* disponible en la siguiente URL:

[http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi).

**Tabla 9:** nombre y secuencia utilizados para la amplificación de la región promotora del gen *TPSAB1*.

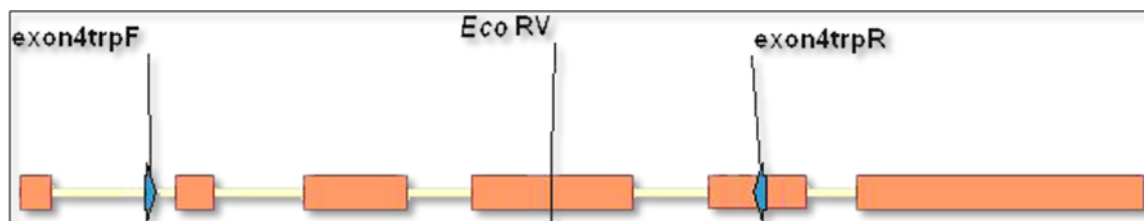
FRAGMENTO	DENOMINACIÓN	SECUENCIA
1	<b>TPSprom864F</b>	5'-CATACGGCGGGTGGGGAGC-3'
1	<b>TPSprom239R</b>	5'-CGCTCCCTGTTCTTCTACCCA-3'
2	<b>TPSprom292F</b>	5'-CCTCCTCCGCCCCCTCC-3'
2	<b>TPSprom120R</b>	5'-CCTCCCCAGAACCCACCCA-3'

Para amplificar la región promotora se llevó a cabo un diseño basado en la división de esta región promotora en dos fragmentos de 627 pb (de la posición -

864a la -239) y 414 pb (de la posición -292 a la 120), fragmento 1 y fragmento 2 respectivamente (tabla 9).

El programa de amplificación seguido fue el siguiente:

- 95°C, 10 minutos (1 ciclo)
- 95°C, 30 segundos;
- 65°C, 45 segundos; (30 ciclos)
- 72°C, 2 minutos
- 72°C, 5 minutos (1 ciclo).



**Figura 19.** Representación del gen *TPSAB1* y el lugar donde anillan los oligonucleótidos, representados con flechas azules. Los exones se representan como cajas de color naranja.

En el análisis de los **polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)** se procedió a la amplificación mediante PCR de las regiones flanqueantes de dicho polimorfismo; para ello se emplearon los oligonucleótidos *exón4trpF* y *exón4trpR* que se representan en la figura 19 y se detallan en la tabla 10.

El programa utilizado para amplificar el fragmento del exón 4 del gen *TPSAB1* donde se encuentra el RFLP para la enzima de restricción *EcoRV* fue el siguiente:

- 95°C, 10 minutos (1 ciclo)
- 95°C, 30 segundos;
- 68°C, 60 segundos; (35 ciclos)
- 72°C, 60 segundos
- 72°C, 5 minutos (1 ciclo).

**Tabla 10:** denominación y secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR para amplificar la región del exón 4.

DENOMINACIÓN	SECUENCIA
exón4trpF	5'-GCCCTGCCCTGTGAGGCC-3'
exón4trpR	5'-CCGTGTAGGCGCCAAGGTG-3'

Por último, para el **análisis cualitativo de la expresión** se procedió a la obtención de las muestras de ADN complementario (ADNc). Para la amplificación de éste se utilizaron los *oligos* que se indican a continuación (tabla 11).



El programa utilizado para la dicha amplificación fue:

- 95°C, 10 minutos (1 ciclo)
- 95°C, 30 segundos;
- 60°C, 45 segundos; | (30 ciclos)
- 72°C, 2 minutos |
- 72°C, 5 minutos (1 ciclo).

#### 4.4.2.~ PVRIFICACIÓN

La purificación de los fragmentos resultantes de la amplificación se llevó a cabo mediante la enzima comercial ExoSAP-IT® (Affymetrix, Cleveland, USA). Esta enzima trata los productos de PCR de tamaño inferior a 100 pb y superior a 20 kb amplificados valiéndose de la eliminación de los cebadores, nucleótidos y restos de reactivos.

**Tabla 11:** oligonucleótidos utilizados para la amplificación del cDNA.

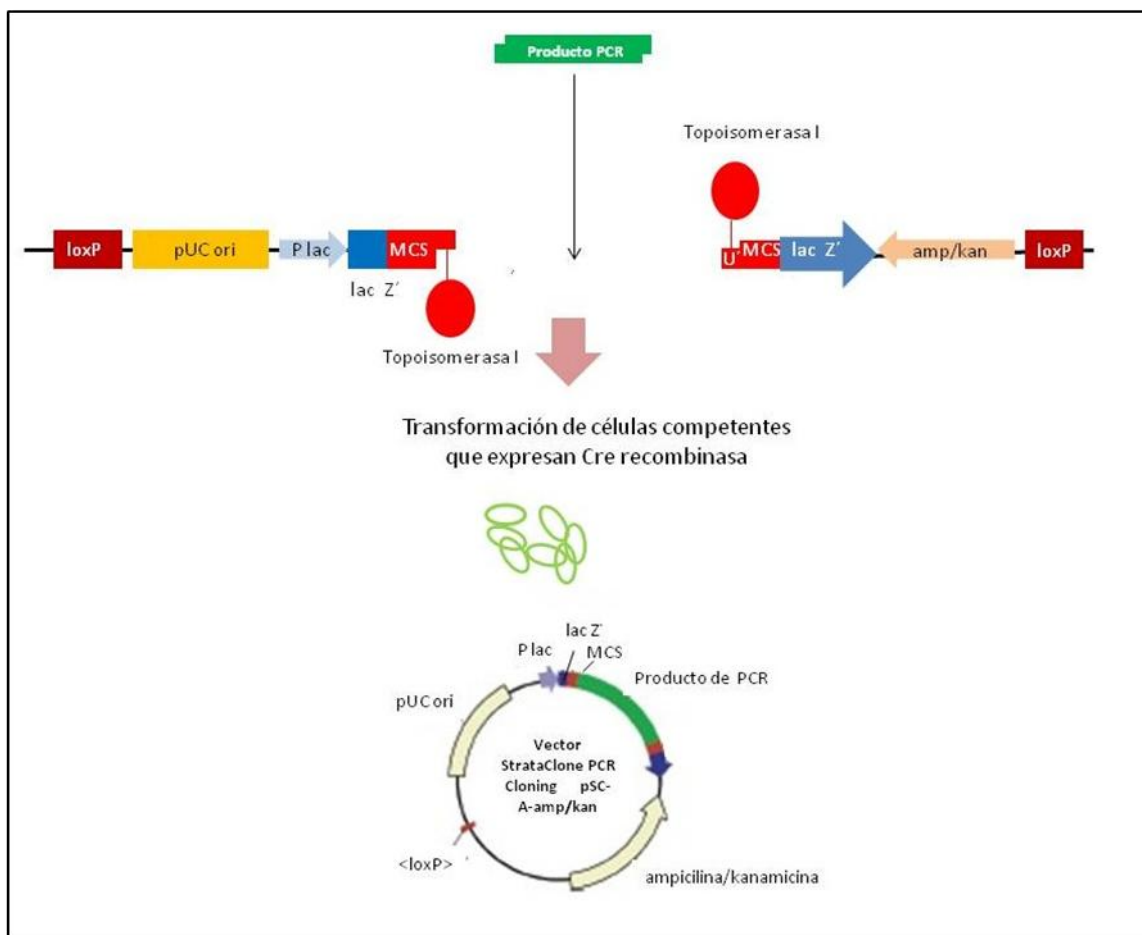
DENOMINACIÓN	SECUENCIA
TPS_E2F	5'- TGCTGAATCTGCTGCTGCTG-3'
TPS_E6R	5'- TCACGGCTTTTTGGGGACAT-3'

El protocolo seguido consistió en añadir 1 µL de ExoSAP-IT® (Affymetrix) a 5 µL del producto de PCR. Posteriormente se incubaba a 37°C durante 15 minutos para degradar los nucleótidos residuales. Posteriormente se realizaba una incubación a

80°C durante 15 minutos para inactivar la enzima. Estas dos incubaciones se llevaron a cabo en un termociclador MWG-BIOTECH (Eurofins, Ebersberg, Germany).

#### 4.4.3.~ CLONACIÓN

Debido a la elevada homología existente entre los distintos genes codificantes de triptasas y con el fin de determinar la posible amplificación mediante las reacciones de PCR de más de un gen se procedió a la clonación de las secuencias (un total de 30 colonias) obtenidas con el kit StrataClone PCR Cloning Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA), figura 20.



**Figura 20.** Resumen del método seguido en el procedimiento de clonación. Tomado del manual del fabricante de StrataClone PCR Cloning Kit.

El fundamento de esta técnica se basa en la combinación de la actividad de la topoisomerasa I de *Vaccinia* y la Cre recombinasa del bacteriófago P1. *In vivo*, la DNA topoisomerasa I interviene en la replicación del ADN por separación y unión de las cadenas de ADN. La topoisomerasa I rompe los enlaces fosfodiéster de la cadena de ADN en la secuencia 5'- CCCTT, formando una unión covalente entre el ADN y la enzima, la cual conserva la energía que posteriormente será utilizada para la reacción de ligación. La Cre recombinasa cataliza la recombinación entre dos secuencias de reconocimiento loxP.

El vector de clonación StrataClone PCR cloning contiene dos extremos de ADN, uno con topoisomerasa I y una secuencia de reconocimiento de loxP en el otro. El primero de los extremos posee uridina modificada (U\*). Los productos resultantes de una reacción de PCR amplificados con Taq poseen extremos sobresalientes de 3'-adenosina que se ligan de manera eficiente a los brazos del vector en una reacción de ligación, debido a la complementariedad A-U\*, seguida por la ligación mediada por la topoisomerasa I.

Posteriormente se produce la transformación de la molécula linear resultante (brazo del vector<sup>ori</sup> - producto de PCR-brazo del vector<sup>amp/kan</sup>) en una línea de células competentes (StrataClone SoloPack Competent Cells, Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA). Estas células han sido diseñadas para expresar la enzima Cre recombinasa. La recombinación entre los sitios del vector, loxP, dan lugar a una molécula de ADN circular (pSC-A-amp/kan) que permite la replicación en células en crecimiento en medio con ampicilina y kanamicina. El vector resultante

pSC-A-amp/kan incluye un *cassette* de  $\alpha$ -complementación y el gen *lacZ'* para una discriminación en función del color (azul o blanco) de la colonia.

El proceso de clonación de los productos de PCR de interés consta de los siguientes pasos:

- 1) Preparación de la reacción de ligación con el vector pSC-A-amp/kan. Para ello se mezclaron 3  $\mu$ L de buffer proporcionado por el kit, 1  $\mu$ L del vector y 2  $\mu$ L del producto de PCR (previamente diluido 1/10). Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se puso la incubación en hielo.
- 2) Transformación bacteriana. Para ello se descongelaron alícuotas de 100  $\mu$ L de células competentes (StrataClone SoloPack). Fueron descongeladas en hielo y se le añadió 1  $\mu$ L de la reacción de ligación. La mezcla fue mantenida en hielo durante 20 minutos tras los cuales se sometieron a un choque térmico de 45 segundos a 42°C y nuevamente se incubó en hielo durante 2 minutos. Se añadieron 500  $\mu$ L de medio LB y se incubaron a agitación moderada a 37°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo las células se inocularon sobre medios sólidos LB con ampicilina 100. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche.
- 3) Selección de las colonias de interés basándose en el método de la Galactosidasa (*lacZ*). Según esto, en la preparación de las placas fue extendido sobre cada placa X-Gal (40  $\mu$ L de solución al 2% en N,N-dimetilformamida (p/v)), que es un sustrato cromogénico de la enzima, antes de añadir la mezcla de transformación. El procesamiento del X-Gal

produce coloración azul, lo que indicará la producción de una enzima  $\beta$ -galactosidasa funcional, por lo que no existe inserto en el sitio de clonación del vector si no que existen vectores que portean el inicio del gen *lacZ* de *E coli*, mientras que en los clones recombinantes no habría producción de enzima y el color de las colonias sería blanco. Estas colonias serán las de interés para los pasos posteriores, por tanto fueron seleccionadas y resembradas en una placa con medio LB con el antibiótico ampicilina durante 12 horas a 37°C.

- 4) Purificación de las secuencias: En este proceso se utilizó el Danaplasmid Spin Miniprep Kit (Genedan, Barcelona, España). Este método lleva a cabo una lisis alcalina modificada, para la posterior purificación se utilizan columnas con membranas de fibra de vidrio que unen selectivamente el ADN plasmídico en presencia de sales caotrópicas. El ADN plasmídico es purificado con varios pasos de lavado para eliminar las impurezas y finalmente es diluido en un volumen final de 50  $\mu$ L. El ADN obtenido puede utilizarse en distintas aplicaciones, incluyendo, como es este caso, la secuenciación automática de ADN.

#### **4.4.5.~ SECVENCIACIÓN**

La secuenciación automática de los fragmentos de DNA procedentes de la amplificación por PCR a partir del ADN genómico, se llevó a cabo en un secuenciador automático modelo ABI PRISM 310 Genetic Analyser y ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Inc, Paisley, UK) (figura 21), usando el cebador específico correspondiente, así como terminadores marcados con cromóforos

fluorescentes y la enzima Taq polimerasa (Perkin Elmer), según las instrucciones recomendadas por el fabricante.

Las reacciones de secuenciación se prepararon con 5  $\mu$ L del producto de la PCR que contenía la secuencia de interés y con 3  $\mu$ L de cebador de la cadena 3'-5' de concentración 1  $\mu$ M, todo ello en un volumen final de 8  $\mu$ L.



**Figura 21.** Secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyser.

Para el estudio de la región promotora, en la secuenciación posterior de estas secuencias se utilizó, además de los cebadores indicados en la descripción del proceso de amplificación, otros dos que anillan en zonas intermedias de estos fragmentos (tabla 12).

**Tabla 12:** nombre y secuencia utilizados para la secuenciación de la región promotora del gen *TPSAB1*

FRAGMENTO	DENOMINACIÓN	SECUENCIA
1	TPSprom670F	5'-GGCACCTTCCCGTCTCTTG-3'
1	TPSprom492R	5'-AACCCACCACCTTCCCGCT-3'
2	TPSprom88R	5'-TTATGGGGTGAAGAATGGAGC-3'

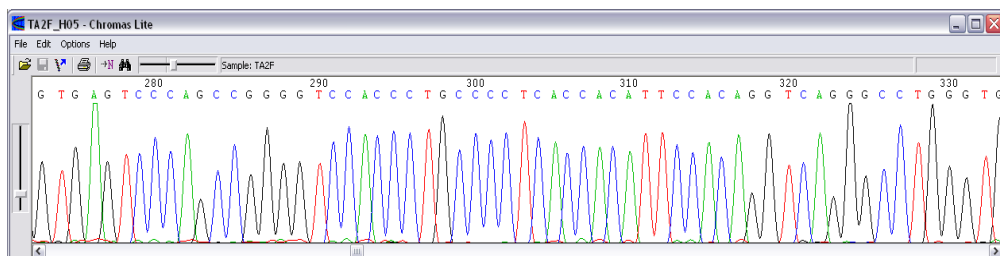
El análisis de las secuencias obtenidas se llevó a cabo usando el programa informático Chromas.Pro versión 1.32 (Technelysium Ptv. Ltd. 1998-2004), figura 22.

#### 4.4.6.~ ANÁLISIS DE RFLP (*RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISMS*)

El análisis de la forma  $\alpha$  del gen *TPSAB1* para el estudio del SNP 363C>T se realizó mediante las enzimas de restricción propuestas por Soto y cols (13). Para ello se empleó la enzima de restricción *EcoRV* (10 U/ $\mu$ l), (Roche, Penzberg, Germany).

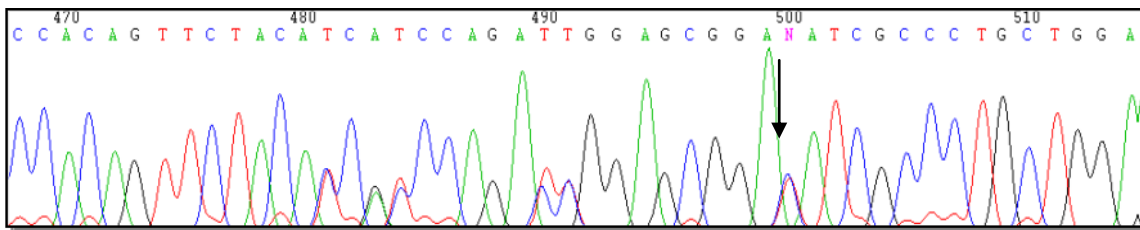
##### a) Digestión con la enzima de restricción *EcoRV*

Los amplicones del gen *TPSAB1* correspondientes al exón 4, según se indicó en la sección 4.4.1. se sometieron a digestión con la enzima *EcoRV* (Roche Diagnostics GMBH, Penzberg, Germany). Para ello se preparó una reacción en un volumen total de 25  $\mu$ l, con 1  $\mu$ l de enzima (10 U/ $\mu$ l), 2,5  $\mu$ l de buffer (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM 2-Mercaptoetanol, 0,1 mM PMSF, 0,02% Polidocanol, 50% glicerol) y 21,5  $\mu$ l de la muestra amplificada. La mezcla resultante se incubó a 37°C durante 16 horas.



**Figura 22.** Secuencia del gen *TPSAB1* de un individuo control utilizando el programa Chromas.Pro 1.32

El sitio de restricción reconocido por dicha enzima es la timina de la secuencia 5'-GCGGATATCGC-3'; el SNP 363C>T consiste en la sustitución de la citosina por la timina en esta posición, de tal manera que en las secuencias en las que en esa posición se localiza la citosina (secuencia sin mutación) la enzima de restricción no corta el fragmento del gen y por el contrario en los casos en los que se produce la sustitución por la timina se produce el corte del fragmento. En la figura 23 se observa que el individuo es heterocigoto para el sitio reconocido por la enzima.



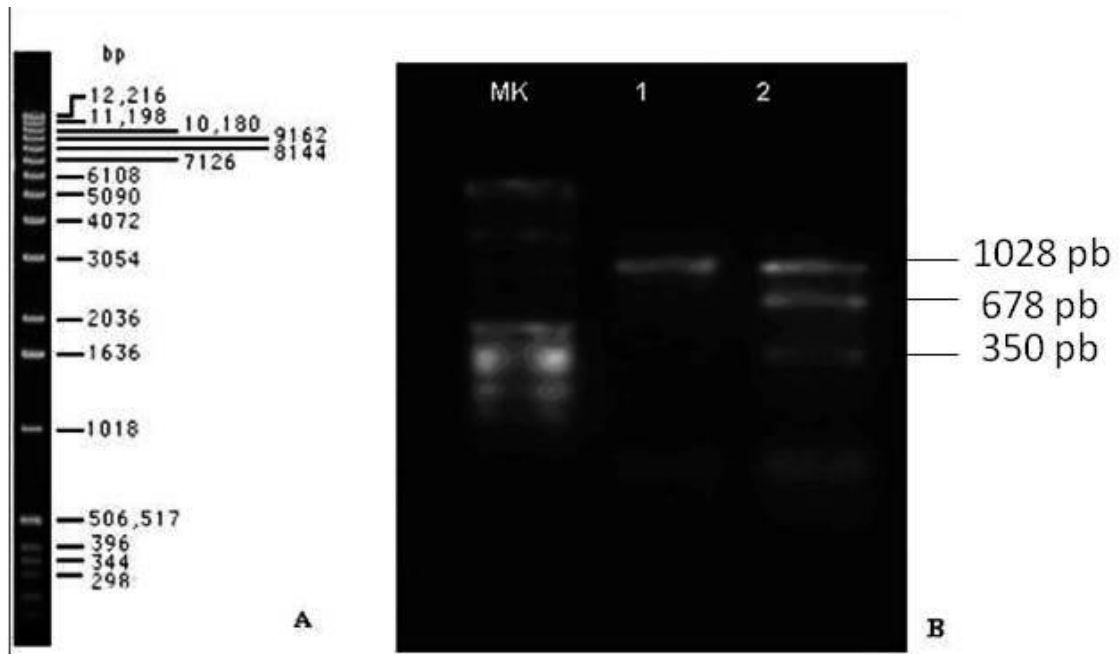
**Figura 23.** Secuencia del fragmento del exón 4 del gen *TPSAB1* (Visualizada con el programa Chromas.Pro 1.32) de un individuo control heterocigoto para la posición del SNP 363C>T que se señala con la punta de flecha.

### b) Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos amplificados mediante PCR convencional, fueron separados por su tamaño molecular mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa de alta resolución al 2% (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Germany) con tampón 10X TAE (Promega, Madison, USA). Los fragmentos amplificados se visualizaron en el gel de agarosa utilizando bromuro de etidio (0,5 µg/ml), que actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del DNA y emitiendo fluorescencia al ser expuesto en



un transiluminador a la luz UV. El marcador utilizado es 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen, München, Germany) cuyo patrón de bandas se observa en la figura 24.



**Figura 24. A:** patrón de bandas para el marcador de DNA de 1 Kb de Invitrogen. La imagen representa un marcador en un gel de electroforesis al 0,9% y cada banda cuenta con 0,5 µg. El gel fue teñido con bromuro de etidio. **B:** Separación de los fragmentos resultantes de la digestión. El primer patrón de bandas (Mk) corresponde con el marcador, la muestra número 1 con un fragmento del exón 4 del gen *TPSAB1* sin digerir (1028 pares de bases) y la muestra 2 que presenta 3 bandas es el resultado del reconocimiento de la enzima *EcoRV* del sitio de restricción en uno de los alelos (individuo heterocigótico), de tal manera que resultan una banda de 1028 pb (alelo no digerido) y dos del alelo digerido (678 y 350 pares de bases)

En este gel se separan bandas de 1028, 678 y 350 pares de bases. La banda de mayor tamaño corresponde al fragmento del exón 4 en el que la enzima no ha reconocido ningún sitio de restricción, las otras dos son el resultado del corte del

amplificación por parte de la enzima, resultando dos bandas de 678 y 350 pares de bases.

Los resultados obtenidos fueron visualizados y almacenados mediante un sistema trans-iluminador VisiDoc-It™ Imaging System (Uplant, CA, USA).

#### **4.4.7.~ ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA**

Otro de los análisis que comprenden este análisis molecular del gen *TPSAB1* consistió en un estudio de la expresión cualitativo de dicho gen en los pacientes, individuos con triptasa alta (paciente 1 y 2 con triptasa elevada y relación familiar – hermanas- y paciente 3 con triptasa elevada y sin relación familiar con las pacientes anteriores) y en cuatro controles.

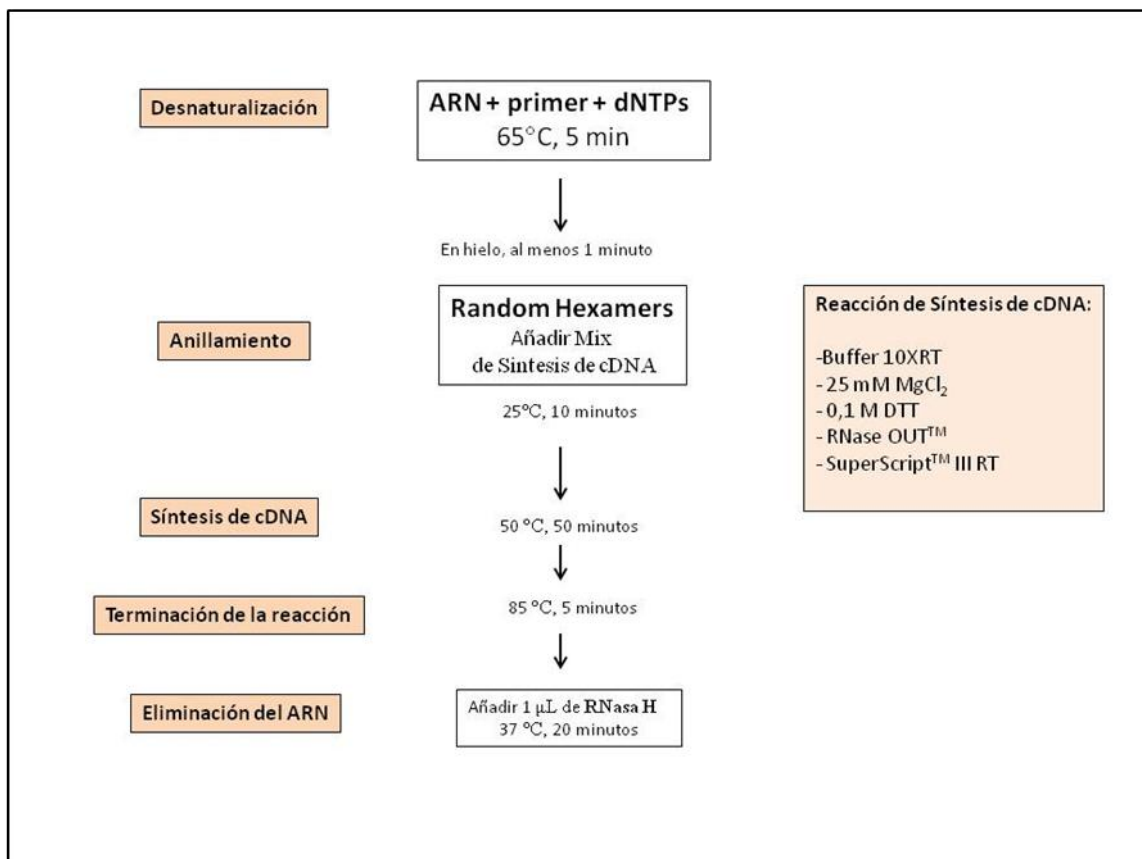
Este estudio se realizó con el fin de determinar si las modificaciones previamente descritas en este estudio dan lugar a modificaciones en la secuencia y tamaño del ADN complementario resultante de la retrotranscripción del ARN. También se realizó un análisis de expresión cuantitativo en el mismo grupo de individuos.

##### **a) Obtención de ADN complementario (ADNc)**

Para la obtención de ADNc se pone de manifiesto la reversibilidad del proceso de transcripción de ADN a ARN por mediación de una enzima retrotranscriptasa.

Para la obtención de las muestras de ADN complementario se utilizó *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Life Technologies, Calsbad, California, USA). Este kit está optimizado para sintetizar la

primera cadena de ADNc a partir de poly (A)<sup>+</sup> o de ARN total. Incluso los ARN que comprenden 100 pb a 12 kb son detectados con el sistema. En este caso la cantidad de material de partida puede variar entre 1 pg y 5 µg de ARN total. Como indica el manual del kit la transcriptasa SuperScript<sup>TM</sup> III es una versión de M-MLV RT, de modo que ha sido diseñada para reducir la actividad de la RNasa H, lo que permite un aumento de la estabilidad térmica. Esta enzima sintetiza ADNc a una temperatura entre los 42 y 55°C, proporcionando un incremento de la especificidad.



**Figura 25.** Resumen del procedimiento seguido para la obtención de la población de cDNA total a partir de ARN siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el primer paso de la síntesis se utiliza ARN y *random hexamers* (cebadores aleatorios de seis nucleótidos) como cebadores. En el segundo paso, una vez obtenido la población de ADNc total se amplificó el ADNc del gen de interés mediante una PCR con oligonucleótidos específicos para cada gen. En la figura 25 se refleja el protocolo sugerido por el fabricante.

#### b) Análisis de expresión por PCR a tiempo real (RT-PCR)

El análisis de expresión cuantitativo se llevó a cabo en el mismo grupo de pacientes con triptasa elevada y controles que en caso anterior. Previo al análisis por el método  $\Delta\Delta C_t$  se llevó a cabo un estudio de la eficiencia de los oligonucleótidos utilizados, TPS (gen de la triptasa) que anilla en el final del exón 4 y principio del 5 y el endógeno TBP (*TATA box binding protein*). El diseño de los cebadores de triptasa aseguran la amplificación del ADN complementario y no del ADN genómico. Los oligonucleótidos utilizados se reflejan en la tabla 13.

**Tabla 13:** oligonucleótidos para *Real Time* PCR utilizados en el análisis de expresión cuantitativa.

Oligonucleótidos	Secuencia
TPS_RT-PCR F	5'-GCGATGTGGACAATGATGAG-3'
TPS_RT-PCR R	5'-TTCCATTATGGGGACCTTCA-3'
TBP F	5'-ATAGGGATTCCGGGAGTCAT-3'
TBP R	5'-GAACATCATGGATCAGAACAACA-3'

El análisis de la eficiencia se hace necesario con el fin de realizar el experimento de expresión bajo el método  $\Delta\Delta C_t$ . Para ello se utilizarán diluciones

seriadas (1:4) de una muestra de ADN complementario conocida, el rango de concentraciones oscila de 20 ng/μL y 0,078 ng/μL). La eficiencia obtenida para el gen endógeno es de 91,67 %, debido a esto y a que el ciclo de amplificación Ct está próximo a nuestro gen problema se consideró su utilización como referencia en el experimento de expresión.

La amplificación mediante PCR de las secuencias de ADNc correspondientes se llevó a cabo utilizando el sistema SYBR Green I Master (Roche, Indianapolis, IN, USA). Cada reacción fue preparada añadiendo 7,5 μL de Master Mix SYBR Green, 1,3 μL de agua, 1,2 μL de la mezcla de los oligonucleótidos (sentido y antisentido) a una concentración de 10 μM cada uno) y 5 μL de ADNc de concentración conocida (25 ng/μL). El volumen final de reacción fue en todos los casos de 15 μL y se incluyeron 2 controles negativos para cada par de cebadores utilizados. El experimento se llevó a cabo en el termociclador LightCycler 480 (Roche, Indianapolis, IN, USA).

El programa de amplificación seguido se refleja en la tabla 14.

**Tabla 14:** programa de amplificación de RT-PCR.

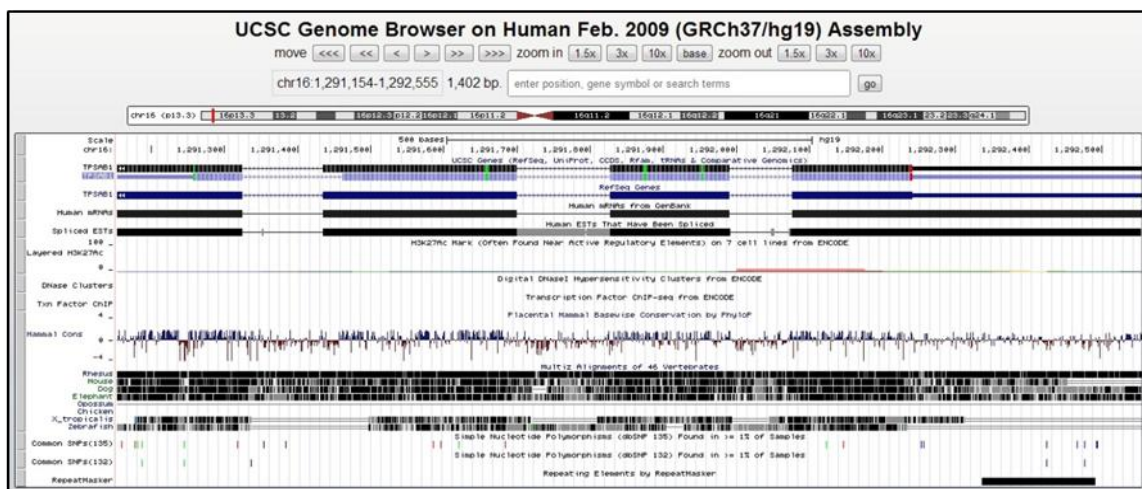
	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (mm:ss)	Rampa (°C/s)	Adquisición
<b>Pre-incubación</b>	1	95	5	4,4	-
<b>Amplificación</b>	45	95	00:10	4,4	-
		60	00:10	2,2	-
		72	00:10	4,4	Única
<b>Melting curve</b>	1	95	00:05	4,4	-
		65	01:00	2,2	-
		97	Continua	0,11	(5/s)
<b>Enfriamiento</b>	-	40	00:30	2,2	-

## 4.5.~ BASES DE DATOS Y PLATAFORMAS ANALÍTICAS

Para el estudio del gen *TPSAB1* fue necesario consultar las bases de datos donde ha sido anotada la secuencia consenso del gen, así como de los distintos genes pertenecientes a la familia de la triptasa que, como ha sido mencionado anteriormente, presentan una elevada similitud entre sí; también fue necesario recabar toda la información disponible sobre los mismos.

### 4.5.1.~ GENOME BROWSER

Esta base de datos está disponible en <http://genome.ucsc.edu/> para su libre acceso y consulta, y ha sido desarrollada por la Universidad de California, Santa Cruz, EE.UU. En ella se puede buscar por nombre o código de la secuencia consenso, de modo que la primera información que se proporciona es su localización en el cromosoma, tamaño y distintas formas del gen descritas en humanos así como los ARN mensajeros descritos, polimorfismos y comparaciones gráficas con el mismo gen en otras especies, tal como se muestra en la figura 26.



**Figura 26.** Gráfico obtenido en la búsqueda del gen *TPSAB1* en la base UCSC Genome Browser.

Una vez seleccionada la secuencia de interés la base de datos proporciona una descripción del gen, de su estructura, indica la secuencia y enlace a otras bases de datos, aporta datos de expresión de microarrays, de la estructura secundaria del ARN mensajero, información de la estructura proteica.

### 4.5.2.~ ACEVIEW

Esta base de datos proporciona una representación comprensiva, no redundante de todas las secuencias de ARNm publicadas (obtenidos de GenBank o RefSeq, y secuencias de cadena sencilla de ADNc obtenidas de dbEST y Trace). Estas secuencias de ADNc experimentales son primero co-alineadas en el genoma y establecen *clusters* (agrupaciones) con un número mínimo de variantes de transcritos alternativos. Los resultados de la búsqueda tal y como se observan en la pantalla se reflejan en la figura 27.

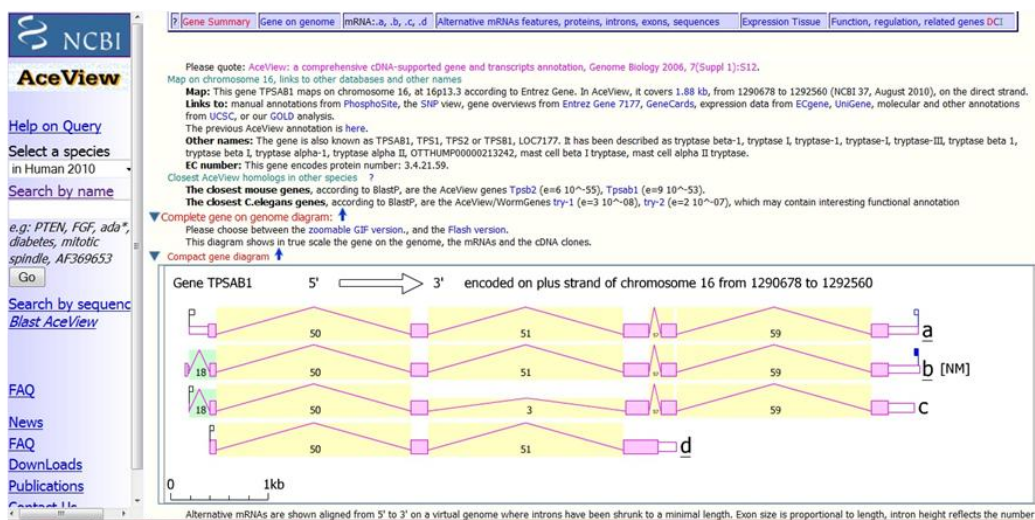


Figura 27. Visualización de los resultados de la búsqueda del gen *TPSAB1* en AceView.

En esta base se recogen también las características del promotor, intrones y exones, señales de poliadenilación, dominios y homologías entre muchas otras secuencias; que son anotadas en profundidad. Además, se anotan los tejidos donde se ha observado expresión de ARN mensajero, enfermedades, fenotipos, funciones o localización. Esta base de datos está disponible en la dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/>.

#### **4.5.3.~ GENECARDS®**

Esta base de datos está disponible en <http://www.genecards.org>, desarrollada por *Crown Human Genome Center*, Departamento de Genética Molecular, *Weizmann Institute of Science*, Rehovot, Israel. En ella se pueden encontrar los enlaces a otras bases de datos, proteínas relacionadas con el gen, dominios proteicos, vías e interacciones, fármacos, transcritos descritos, variantes génicas y enfermedades descritas relacionadas con dicho gen. La figura 28 representa el resultado obtenido tras la búsqueda del gen *TPSAB1*.

#### **4.5.4.~ NCBI**

Esta base de datos, del *National Center for Biotechnology Information*, dbSNP (*Short Genetic Variations*), se encuentra disponible en la dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>, y recoge las variantes polimórficas disponibles para los genes de triptasa, indicando su localización, validación, modificación prevista, así como su función y aminoácido en el que se localiza.



The screenshot shows the GeneCards website interface. At the top, there are logos for GeneCards, Weizmann Institute of Science, and LifeMap Sciences. Below the navigation bar, a search bar contains the keyword 'TPSAB1'. The main content area displays the following information:

- Gene Name:** *TPSAB1* Gene
- Aliases:** *tryptase alpha/beta 1* (Previous name: *tryptase beta 1*)
- Protein-coding:** *GIFTS: 57*
- GCID:** GC16P001290
- TPSAB1:** Approved symbol from the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) database (Previous symbols: TPSB1, TPS1, TPS2)
- Aliases & Descriptions:**
  - tryptase alpha/beta 1<sup>1,2</sup>
  - tryptase alpha II<sup>2</sup>
  - TPS1<sup>1,2,3,5</sup>
  - tryptase alpha/beta-1<sup>2</sup>
  - TPS2<sup>1,2,3</sup>
  - tryptase beta I<sup>2</sup>
  - TPSB1<sup>1,2,3</sup>
  - tryptase beta-1<sup>2</sup>
  - tryptase beta 1<sup>1,2</sup>
  - tryptase-1<sup>2</sup>
  - Tryptase alpha-12<sup>3</sup>
  - tryptase-II<sup>2</sup>
  - Tryptase I<sup>2,3</sup>
  - tryptase-III<sup>2</sup>
  - EC 3.4.21.59<sup>8</sup>
  - Tryptase-1<sup>2</sup>
  - mast cell alpha II tryptase<sup>2</sup>
  - EC 3.4.21<sup>8</sup>
  - mast cell beta I tryptase<sup>2</sup>
- External Ids:** HGNC: 12019<sup>1</sup>, Entrez Gene: 7177<sup>2</sup>, Ensembl: ENSG00000172236<sup>2</sup>, OMIM: 191080<sup>6</sup>, UniProtKB: Q15661<sup>3</sup>

**Figura 28.** Resultados obtenidos con la búsqueda del gen *TPSAB1* en la base de datos GeneCards.

La figura 29 refleja los datos obtenidos para el gen consultado.

#### 4.6.~ SOFTWARE PARA EL DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

La herramienta *online* utilizada para el diseño de los oligonucleótidos utilizados en este estudio fue Primer3Plus, disponible en la dirección <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>. Esta herramienta permite seleccionar los pares de cebadores para una secuencia concreta y especificar determinadas regiones que pueden incluirse o excluirse (157). Con este programa (figura 30) es posible integrar cinco situaciones distintas en los que los oligos pueden ser utilizados, como es el caso de detección, clonación, secuenciación, chequeo de *primers* y obtención de una lista de oligonucleótidos para una secuencia concreta.

El éxito de una buena amplificación radica en la unión específica del oligonucleótido a la secuencia problema, la especificidad de esta unión está determinada por propiedades del oligonucleótido como la temperatura de *melting* ( $T_m$ ) (Temperatura de Fusión), el contenido en GC y su propia complementariedad (158).

The screenshot shows the NCBI dbSNP interface for the gene *TPSAB1*. The search results table is as follows:

Region	Chr.	mRNA position	dbSNP rs#	Heterozygosity	Validation	MAF	Allele origin	3D Linkout	Function	dbSNP allele	Protein residue	Codon pos	Amino acid pos	PubMed
5' near gene	1288686		rs189163597	N.D.		0.0009			5' near gene A/G					
	1288689		rs193068907	N.D.		0.0018			5' near gene A/G					
	1288712		rs3760123	N.D.	✗	0.0261		↳	5' near gene A/G					
	1288726		rs184534644	N.D.		0.0037			5' near gene A/G					
	1288754		rs34925202	N.D.					5' near gene -G					
	1288794		rs67422897	0.500	↳			↳	5' near gene (-6bp)					
	1288794		rs111985631	N.D.				↳	5' near gene -AT					
	1288795		rs58792599	N.D.					5' near gene -TA					
	1288795		rs201181724	N.D.					5' near gene A/C/G					
	1288865		rs149465774	N.D.		0.0005			5' near gene A/G					
	1288881		rs3760122	N.D.	✗	0.2738		↳	5' near gene A/C					
	1288930		rs111432558	0.500				↳	5' near gene A/C					
	1289086		rs3809640	N.D.		0.1200		↳	5' near gene C/T					
	1289141		rs62012901	N.D.					5' near gene A/G					

Figura 29. Resultados obtenidos en la base dbSNP del ncbi para el gen *TPSAB1*.

El uso que en este caso se ha dado de la herramienta es para el diseño de cebadores para su uso en amplificación y secuenciación, por tanto es posible diseñar oligonucleótidos en ambas cadenas, sentido y antisentido y a no ser que se indique lo contrario los oligos son diseñados con un intervalo de 500 nucleótidos en ambas cadenas.

## 4.7.- ANÁLISIS DE LOS DATOS

Para el estudio e interpretación de los datos se han utilizado diversos programas informáticos. Los utilizados para este estudio se enumeran a continuación:

### 4.7.1.- VECTOR NTI

Vector NTI 10 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) es un programa informático que proporciona un amplio abanico de opciones; entre otras posibilidades, permite diseñar los oligos para posteriormente utilizarlos en secuenciación, amplificación, y alineamiento de productos resultantes de PCR.

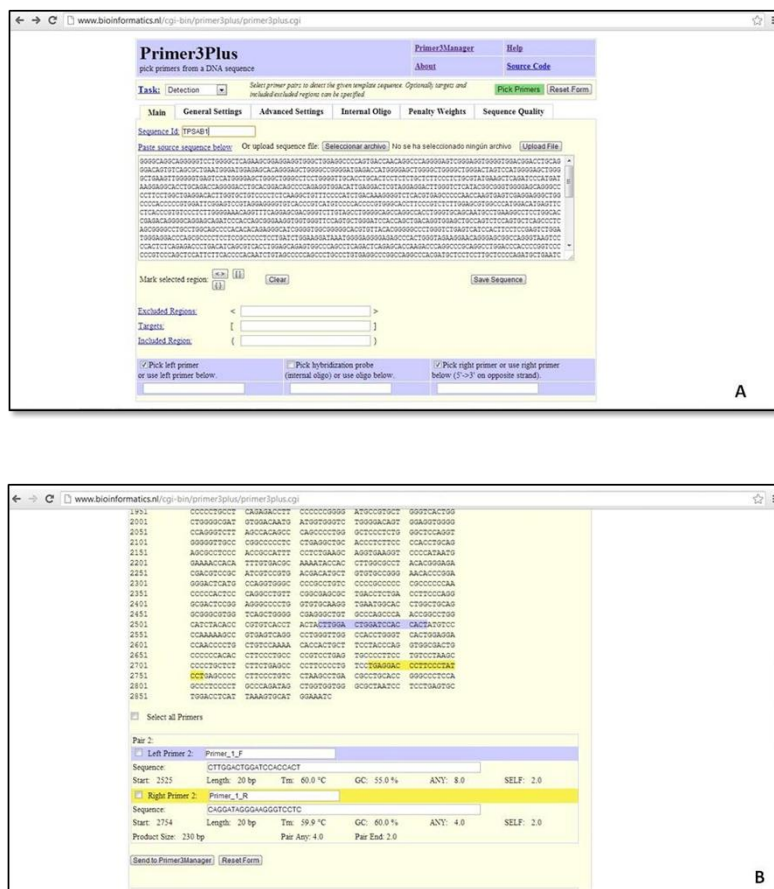
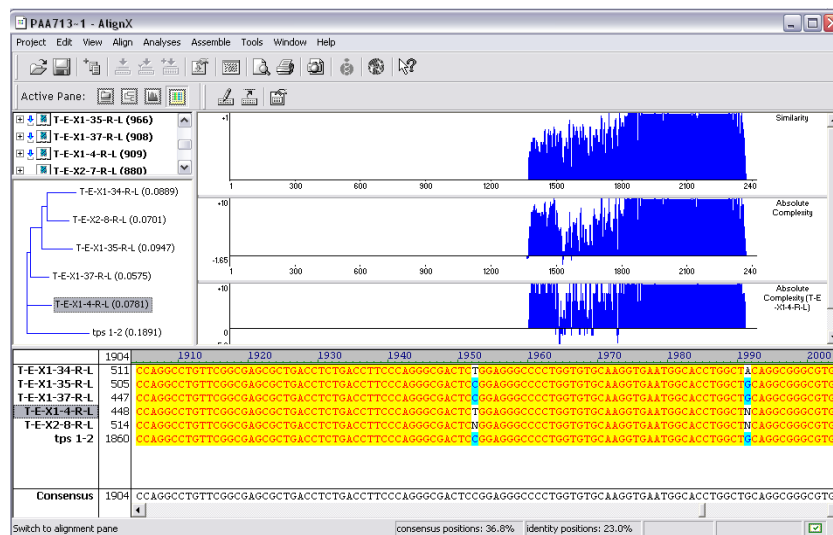


Figura 30. **A:** interfaz de entrada del software Primer3Plus. **B:** pantalla de salida para los oligos diseñados para la secuencia del gen *TPSAB1*.

En el caso de nuestro estudio, dicho programa se utilizó para realizar el alineamiento de múltiples secuencias obtenidas tras amplificación por PCR y secuenciación en el sistema automatizado *ABI PRISM 310 Genetic Analyser* (Applied Biosystems, Inc), por *ClustalW algorithm*. En estas alineaciones el programa indica el porcentaje de similitud, en qué regiones concretas de las secuencias y el grado de complejidad (figura 31).

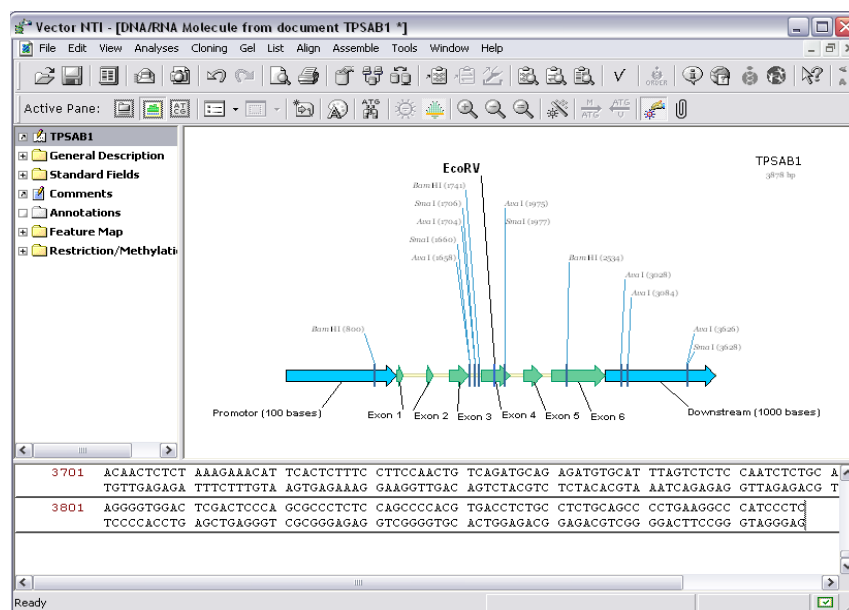


**Figura 31.** Alineamiento de una secuencia en Vector NTI 10 resultante de amplificación por PCR y dos secuencias obtenidas de bases de datos de los genes *TPSAB1* y *TPSB2*.

El programa cuenta, además, con una base de datos en la que se puede introducir la molécula de interés. Se realizó una caracterización de las regiones exónicas e intrónicas así como realización de un mapa de restricción para localización específica (figura 32).

### 4.7.2.- BLAST

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) es un programa *on-line*, disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> desarrollado por los Institutos Nacionales de Salud de EE.UU., al que se accede gratuitamente desde el servidor del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).



**Figura 32.** Esquema en Vector NTI del gen *TPSAB1*

Es un programa de alineamiento de secuencias que compara una secuencia problema (*query*) con las secuencias depositadas en la base de datos. Mediante un algoritmo heurístico analiza la similitud con las secuencias de la base de datos para comparación y proporciona un valor de similitud, que permite hacerse una idea del nivel de parecido entre la secuencia problema y las secuencias consenso depositadas en las bases de datos. Sin embargo, es capaz de calcular la significación

de sus resultados, por lo que proporciona un parámetro para juzgar los resultados obtenidos.

#### 4.7.3.- SPSS

En este estudio se ha utilizado el programa estadístico SPSS versión 19.0. (Chicago, Illinois, USA). El programa, ampliamente utilizado, es una potente herramienta para realizar análisis estadísticos. Las pruebas estadísticas que se han realizado con este programa se muestran a continuación:

- *Prueba de  $\chi^2$* : Las variables dicotómicas se analizaron mediante el test  $\chi^2$ , en tablas de contingencia para comparar la distribución de las variables categóricas.
- *Prueba exacta de Fisher*: consiste en un ajuste para calcular la probabilidad exacta de obtener el resultado observado.
- *Simulación de Monte Carlo*: este procedimiento agrupa una serie de procedimientos que analizan distribuciones de variables aleatorias usando simulación de números aleatorios.
- *Odds Ratio*: con intervalo de confianza al 95% para el cálculo del riesgo.
- *ANOVA*: modelo estadístico por el que se compara si los valores de un conjunto de datos son estadísticamente significativos de otros conjuntos de valores. Además se realizó análisis de la homogeneidad de varianzas (Estadístico de Levene).
- *Análisis de la normalidad de la distribución*: Z de Kolmogorov-Smirnov

- *Regresión Logística*: método multivariante que permite analizar simultáneamente diversas variables para evitar posibles sesgos de interpretación en los estudios de asociación.

#### **4.7.4.- SHESIS**

Esta herramienta *online* es útil para el análisis de la distribución alélica y genotípica así como estudio del equilibrio de HW y estudio de haplotipos. El programa está disponible en <http://www.nhgg.org/analysis> (159).

Para el análisis, reconstruye haplotipos ambiguos y estima las frecuencias correspondientes cuya exactitud mejora al incrementar el número de muestras. Es posible, también, estimar la frecuencia haplotípica de casos y controles de manera individual y global.

*Equilibrio de Hardy-Weinberg*: El equilibrio de Hardy-Weinberg valorado para la distribución genotípica mediante el test  $\chi^2$ , asimismo se calculó la p de Pearson.

#### **4.7.5.- SNP ANALYZER**

Este programa, disponible en la siguiente dirección: [http://www.istech.info/istech/board/login\\_form.jsp](http://www.istech.info/istech/board/login_form.jsp), posibilita el cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg, la estimación haplotípica, y el análisis de los rasgos cuantitativos de cada locus. Existe la posibilidad de realizar estos cálculos por medio de distintos algoritmos, lo que permite la comparación de distintos resultados generados por ellos. Se ha empleado para la predicción de diplotipos mediante tres algoritmos básicos *Clark*, *EM* y el *Pseudo Gibbs Sampler algorithm* (PGS) (160).

También permite medir la discrepancia entre las verdaderas frecuencias haplotípicas y la frecuencia del haplotipo estimada.

#### **4.7.6.- ESTUDIO DEL PODER ESTADÍSTICO**

El poder estadístico se ha analizado mediante los programas disponibles en los enlaces [http://www.dssresearch.com/toolkit/sscalc/size\\_a2.asp](http://www.dssresearch.com/toolkit/sscalc/size_a2.asp) y <http://statpages.org/proppowr.html>. Con estas herramientas es posible calcular el tamaño de las poblaciones necesarias para detectar diferencias estadísticamente significativas entre ellas conociendo la frecuencia de cada uno de los grupos.

#### **4.7.7.- ANÁLISIS *IN SILICO* DEL PROMOTOR**

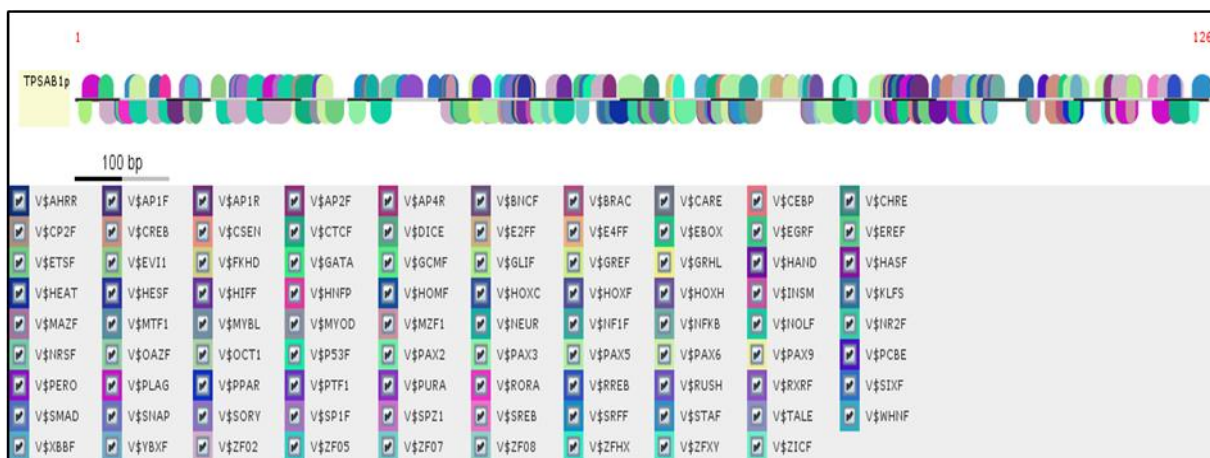
Para el conocimiento de la expresión génica es necesario hacer hincapié en el proceso de regulación génica, donde tienen especial importancia la unión de factores de transcripción (elementos trans) a una secuencia corta de ADN (elementos cis). La presencia de un factor unida a una región del promotor concreta de un gen puede aumentar o disminuir la expresión de dicho gen. Cada uno de estos factores de transcripción reconoce una familia de secuencias similares, generalmente entre 4 y 10 pares de bases de longitud con variabilidad en el grado de conservación de cada posición (161).

Para el análisis *in silico* de las secuencias del promotor de los genes de interés y de los pacientes con niveles de triptasa elevada así como de los factores de transcripción que se unen a las regiones del promotor, tanto secuencia consenso (descrita y anotada en las bases de datos consultadas) como los promotores resultantes de las modificaciones descritas en este trabajo se utilizó el programa



MatInspector, (Genomatix Software GmbH, Munich, Germany) disponible en la URL: [www.genomatix.de](http://www.genomatix.de), figura 33.

Esta herramienta utiliza librerías de matrices descritas para localizar regiones coincidentes en otras secuencias, además se ha comprobado que reduce el riesgo de pérdida de sitios funcionales (falsos negativos) pero puede encontrar falsos positivos debido al escaneo de largas secuencias genómicas. La sensibilidad del método ha de ser establecida por comparación con suficientes datos experimentales (162). Los datos resultantes de este análisis *in silico* indican la unión potencial de los correspondientes factores de transcripción.



**Figura 33.** Esquema representativo de los factores de transcripción obtenidos para el promotor del gen *TPSAB1* y la localización de su unión a lo largo de la secuencia.

Las secuencias reguladoras generalmente contienen muchos sitios con la capacidad de unir factores de transcripción (TF) y la selección de éstas depende de

que dichos factores sean funcionales para la regulación de la transcripción, dependiendo del contexto biológico (163).

Este tipo de análisis se hace indispensable para mutaciones puntuales, desde la delección de sitios de unión o incluso mutaciones de un único nucleótido que pueden cambiar la afinidad de los sitios de unión y modificar las interacciones de las proteínas de unión.

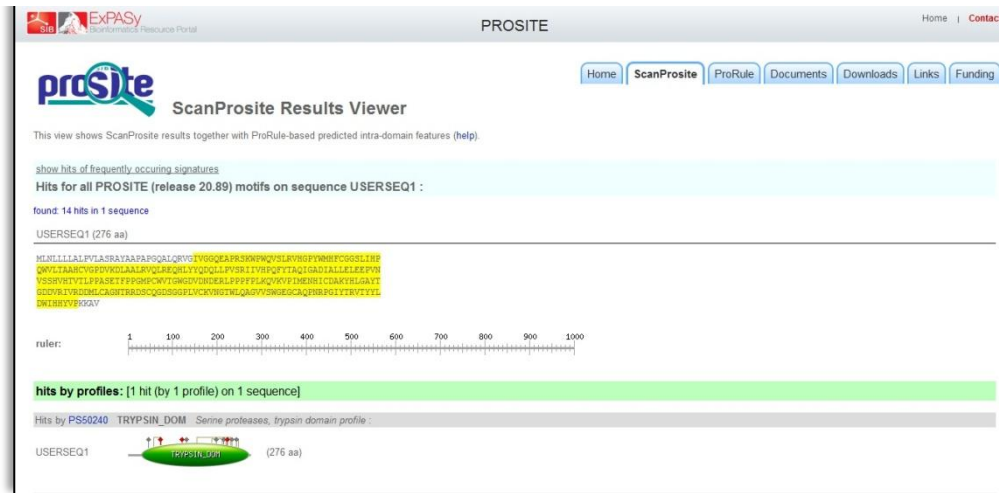
En este programa es posible introducir la secuencia de interés o acudir a las bases de datos para generar una matriz que indique los factores de transcripción que pueden unirse a dicha región.

#### **4.7.8.~ ANÁLISIS *IN SILICO* PROTEICO**

El análisis proteico llevado a cabo fue posible gracias a la herramienta *on-line* <http://www.expasy.org/>, esta es el Portal de SIB Bioinformatics Resource Portal, que proporciona acceso a bases de datos y herramientas en diferentes áreas de ciencias de la vida entre las que se incluye proteómica. Una de las herramientas fundamentales es la que permite traducir una secuencia nucleotídica en la secuencia proteica que codifica.

Una vez obtenida la proteína codificada el análisis *in silico* de los dominios de la misma se realizó por medio de la herramienta *on-line* ScanProsite (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>). Este software permite predecir la función proteica, asignar identidad familiar o detectar homólogos remotos entre otras opciones. Proporciona, además, predicciones de las características de los dominios y establece una asociación entre los dominios detectados con un sistema

de anotación automatizada que puede aumentar significativamente el poder predictivo (164, 165). Un ejemplo del resultado de esta predicción se refleja en la figura 34.



**Figura 34.** Resultados obtenidos en el análisis *in silico* de la proteína codificada por el gen *TPSAB1*.

# RESULTADOS

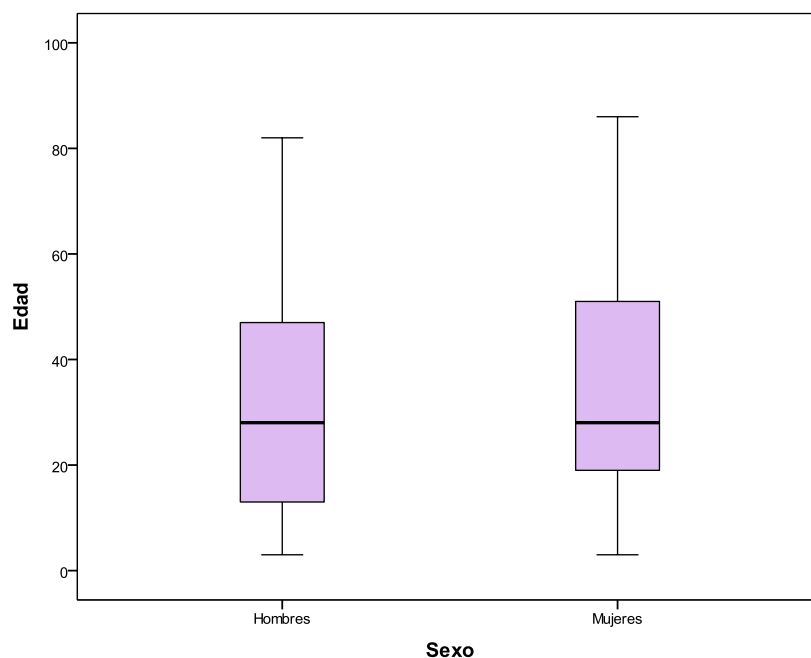




## 5.~ RESULTADOS

### 5.1.~ ESTUDIO DESCRIPTIVO

Se han incluido un total de 319 individuos en el estudio. De ellos, 145 (45,5 %) fueron varones y 174 mujeres (54,5 %). La media de edad para el primer grupo fue de  $30,96 \pm 20,8$  años mientras que para el grupo de mujeres la media de edad fue de  $34,6 \pm 20,4$  años. La dispersión de los datos de cada grupo se refleja en la figura 35.

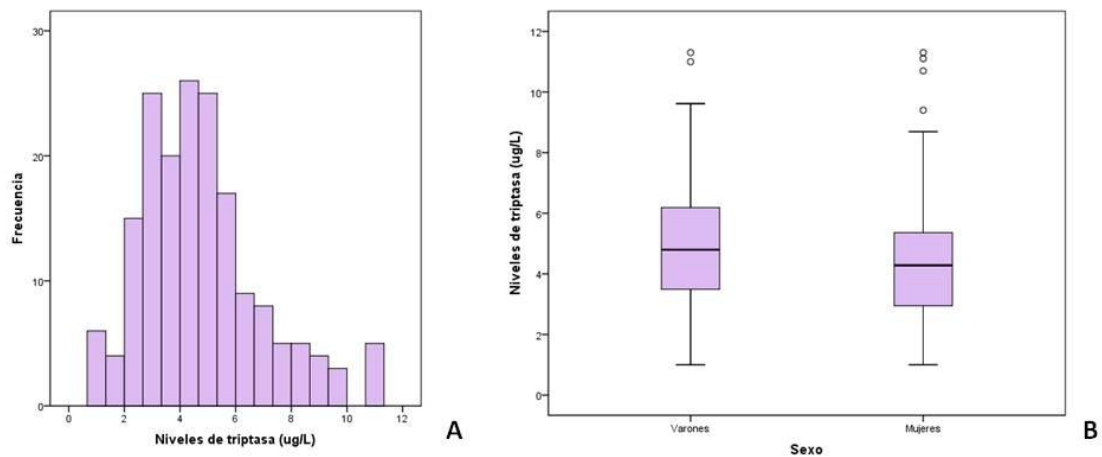


**Figura 35.** Diagrama de cajas que refleja la mediana y dispersión de la edad en función del sexo.

En nuestra población, el número de controles fue de 152; un 37,5% de ellos fueron varones y un 62,5%, mujeres; en el grupo de pacientes (167 individuos) la distribución fue de un 52,7 % de varones, frente al 47,3 % de mujeres. La media de

edad para cada grupo fue de  $44,5 \pm 18,05$  años en el grupo control y de  $22,46 \pm 16,98$  años para el grupo de pacientes.

En los individuos estudiados se determinaron los niveles de triptasa e IgE, cuya distribución se muestra en las figura 36 y figura 37. Los niveles de triptasa en la población de estudio oscilaron entre  $1 \mu\text{g/L}$  y  $11,30 \mu\text{g/L}$  con una media de  $4,74 \pm 2,18 \mu\text{g/L}$ .

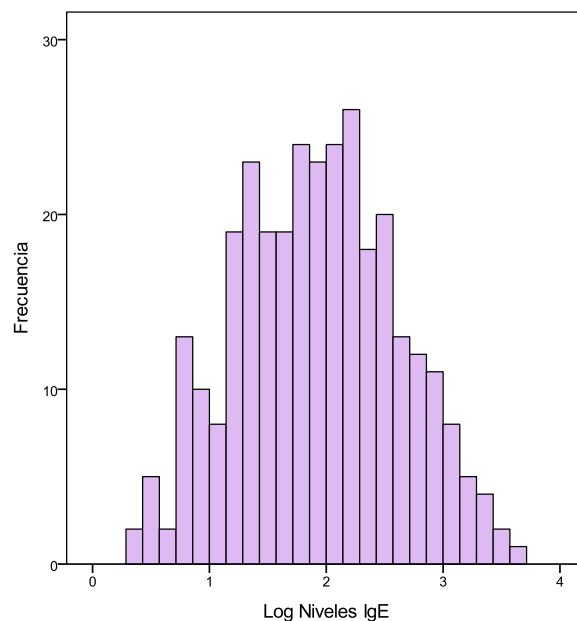


**Figura 36. A:** frecuencias de niveles de triptasa ( $\mu\text{g/L}$ ) en la muestra de estudio. **B:** dispersión de los datos de niveles de triptasa en función del sexo.

Los niveles de IgE fueron transformados en logaritmos para su normalización. Los valores de IgE total en nuestra población oscilaron entre 2,39 y 4517 kU/Ly la media fue de  $270,24 \pm 524,22$  kU/L, mientras que los valores del logaritmo de IgE oscilaron entre 0,38 y 3,65, y la media de fue de  $1,92 \pm 0,69$ .

### 5.1.1.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-BIOLÓGICAS DEL GRUPO CONTROL

Los pacientes del grupo control se emplearon para el análisis de los polimorfismos por secuenciación y por RFLP. El grupo control, que formó parte del **estudio de polimorfismos de un único nucleótido (SNP) por secuenciación**, estaba constituido por 110 individuos, de los cuales 40 (36,36 %) eran varones, con una media de edad de  $43 \pm 16,2$  años, y 70 (73,64 %) mujeres, con una media de  $44 \pm 19,9$  años. En este grupo la media de los valores de IgE fue  $97,57 \pm 265,21$  kU/L y la media del logaritmo de IgE ( $\log \text{IgE}$ ) fue de  $1,5 \pm 0,57$ . Los valores medios de triptasa para este grupo fueron de  $4,75 \pm 2,05$   $\mu\text{g/L}$ . (Tabla 15)



**Figura 37.** Frecuencias del logaritmo de IgE en la muestra de estudio.

El grupo control para el **estudio de polimorfismos mediante el análisis de RFLP** estaba constituido por 135 individuos, de los cuales 50 (37,04 %) eran varones y



85 (62,96 %) mujeres; las medias de edad de los grupos fueron  $46 \pm 16,9$  y  $44 \pm 18,9$  años, respectivamente. La media de los valores de IgE fue de  $81,40 \pm 221,59$  kU/L y para el logaritmo de IgE, de  $1,51 \pm 0,55$ . El nivel medio de triptasa para este grupo de controles fue de  $4,79 \pm 2,11$   $\mu\text{g/L}$ . La comparación de las características de ambos grupos se refleja en la tabla 15.

**Tabla 15:** características clínico-biológicas de los grupos control incluidos en cada uno de los estudios.

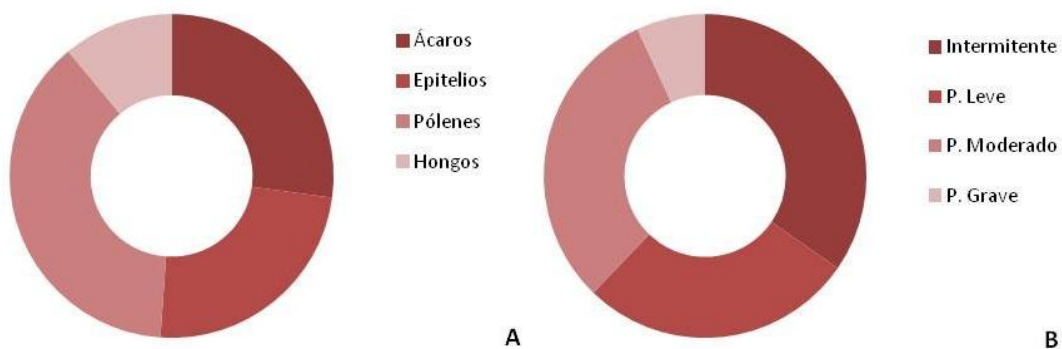
		<b>Análisis de polimorfismos</b>	<b>Análisis de RFLP</b>
<b>Número</b>		110	135
<b>Sexo</b>	Varones (%)	36,36	37,04
	Mujeres (%)	73,64	62,96
<b>Edad</b>	Varones	43	46
	Mujeres	44	44
<b>Niveles IgE (kU/L)</b>		$97,57 \pm 265,21$	$81,40 \pm 221,59$
<b>logIgE</b>		$1,5 \pm 0,57$	$1,51 \pm 0,55$
<b>Niveles de triptasa (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>		$4,75 \pm 2,05$	$4,79 \pm 2,11$

### **5.1.2.~ CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-BIOLÓGICAS DEL GRUPO DE PACIENTES**

El grupo de pacientes estaba constituido por 167 individuos, de los cuales 88 (52,69 %) eran varones, con una media de edad de  $21 \pm 17,4$  años y 79 (47,30 %) mujeres, con una media de edad de  $24 \pm 16,5$  años. Se determinaron los niveles de

IgE, cuya media fue de  $434,8 \pm 646,18$  kU/l; la media del logaritmo de los niveles de IgE fue de  $2,28 \pm 0,6$ .

En este grupo se recogieron datos relacionados con el grado de asma y los resultados de las pruebas intraepidérmicas para aeroalérgenos. Respecto a las pruebas cutáneas, el 31,7 % resultaron positivas para ácaros, el 28,0 % para epitelios, el 44,2 % para pólenes y el 12,9 % para hongos. En cuanto al grado de asma de los pacientes, el 34,5 % presentaba asma intermitente, el 27,6 % persistente leve, el 31 % asma persistente moderada y el 6,9 % asma persistente grave (figura 38).



**Figura 38. A:** distribución de la positividad frente a aeroalérgenos en el grupo de pacientes. **B:** distribución de los pacientes según la gravedad del asma.

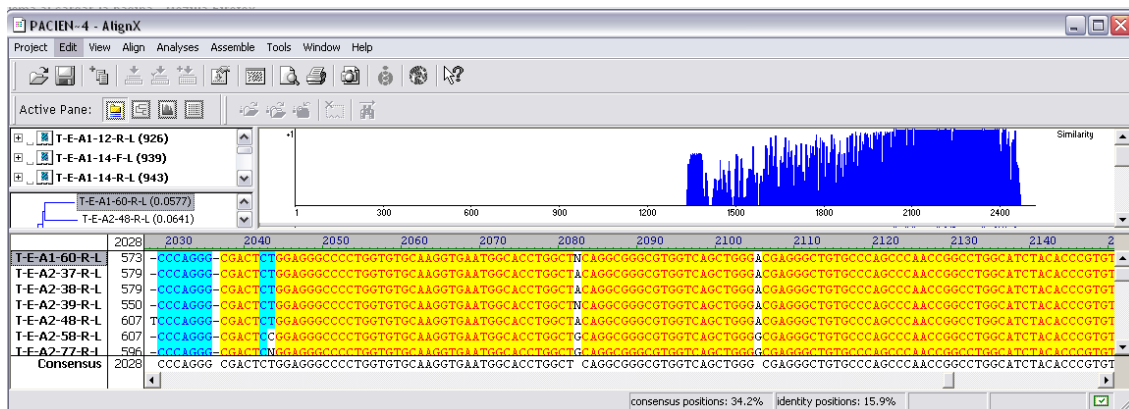
En este grupo de pacientes también se determinaron los niveles de triptasa en suero y se obtuvieron valores medios de  $4,70 \pm 2,25$   $\mu\text{g/L}$ .

## 5.2.- ESTUDIO GENÉTICO DEL GEN *TPSAB1* EN EL GRUPO CONTROL.

### 5.2.1.- IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS DE UN ÚNICO NUCLEÓTIDO (SNP) POR SECUENCIACIÓN

Para analizar la situación de nuestra población se estudiaron los SNP en el grupo control desde dos abordajes metodológicos, por secuenciación y por RFLP.

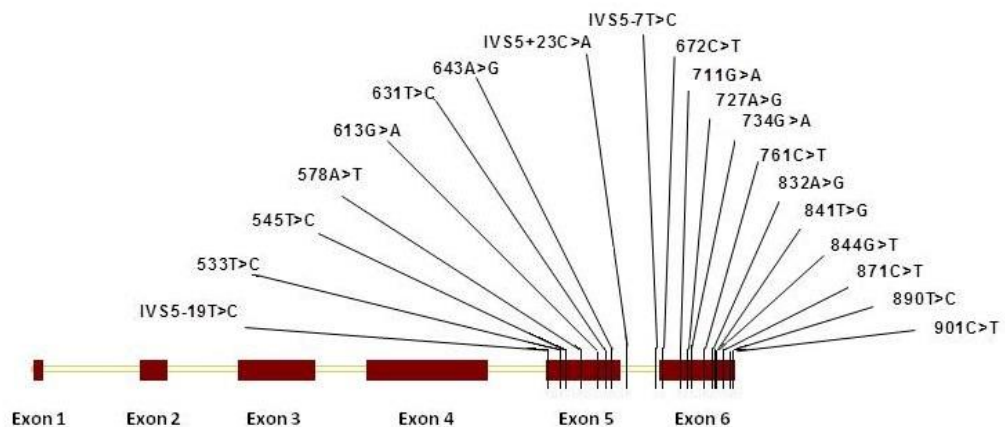
El abordaje previo de secuenciación completa permitió detectar las regiones más informativas, las regiones más polimórficas, que abarcaban los intrones 1 y 5 y los exones 5 y 6. El análisis de dichas regiones en la población control y su alineamiento (figura 39) permitió identificar 19 nuevos SNP en la región 5-6 y 1 en el intrón 1. Además, se analizaron 39 SNP descritos previamente.



**Figura 39.** Ejemplo de alineamiento de las secuencias de los distintos individuos. En color amarillo se indica una similitud del 100%, otros colores indican homología de menor grado.

### *NUEVOS POLIMORFISMOS DESCRITOS EN NUESTRA POBLACIÓN*

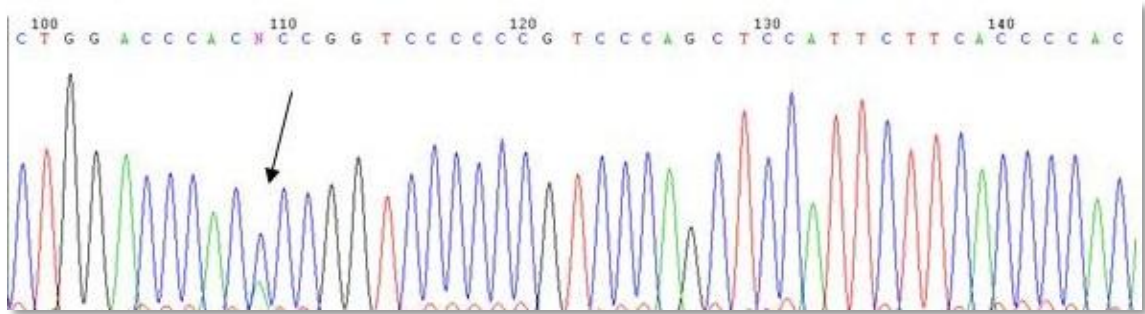
En este estudio se han identificado 19 SNP no referidos previamente. La distribución se refleja en la figura 40. Como se ha comentado, la secuenciación completa del gen proporcionó una región más polimórfica entre los exones 5 y 6, lo que permitió identificar una región de 35 pares de bases en el exón 5 en la que se concentran 6 SNP, mientras que en el intrón 5 y en el exón 6 se detectaron 13 nuevos SNP más ampliamente distribuidos (tabla 16).



**Figura 40.** Representación esquemática de los polimorfismos nuevos estudiados en la región comprendida entre el exón 5 y el exón 6.

En el intrón 1, el análisis de las secuencias tras el alineamiento permitió detectar un nuevo polimorfismo, consistente en una sustitución de citosina por adenina en posición 106, figura 41. Este nuevo SNP se denominó, siguiendo la nomenclatura propuesta por Guida et al.(156), IVS1+106C>A.

En nuestra población, el alelo mutado se detectó con una frecuencia alélica de 0,04 y una frecuencia genotípica de 0,08 en heterocigosis. El equilibrio de Hardy-Weinberg se cumplió para esta distribución ( $p=0,70$ ).



**Figura 41.** Electroferograma (Chromas Lite) obtenido tras amplificación y secuenciación de la región intrónica 1 en el que se incluye el exón 1. La flecha indica el SNP descrito.

En la región polimórfica antes mencionada se describieron los polimorfismos que se detallan en la tabla 16.

De los SNP incluidos en este grupo, dos de ellos codificaban el mismo aminoácido (672C>T y 711G>A), otros generan sustituciones de Gly por Asp (734G>A) o de Val por Ile (613G>A). Otros, como 841T>G, 844G>T, 871C>T y 901C>T se encuentran en región 3' no traducida, por lo que sus efectos aun son desconocidos pero podrían estar relacionados con la regulación transcripcional.

En resumen, en este trabajo se han descrito **19 nuevos SNP** de los cuales se ha determinado la frecuencia alélica y genotípica de 7 que se encuentran en la región de interés. Uno de estos polimorfismos ha sido descrito en el exón 5 (613G>A), otros

SNP se localizaron en el intrón de estudio (IVS5+23C>A) y los cinco restantes se localizan en el exón 6 (672C>T, 711G>A, 734G>A, 841T>G y 844G>T).

Las frecuencias de los alelos mutados de estos nuevos polimorfismos se recogen en la tabla 17. Tres SNP se encontraron con una frecuencia superior a 0,5: 841T>G (0,7), 844G>T (0,78) y, finalmente, IVS5+23C>A (este con una frecuencia de 0,9).

**Tabla 16:** polimorfismos de un único nucleótido (SNP) estudiados en la región comprendida entre el exón 5 y el exón 6.

	Designación del SNP	rs	Localización en el gen	Efecto en proteína
1	533T>A		Exón 5	
2	545T>C		Exón 5	
3	578A>T		Exón 5	
4	613G>A	rs 201280504	Exón 5	Val 205 Ile
5	631T>C		Exón 5	
6	643A>G		Exón 5	
7	IVS5+23C>A		Intrón 5	Intrón
8	IVS5-19T>C		Intrón 5	Intrón
9	IVS5-7T>C		Intrón 5	Intrón
10	672C>T	rs 201539350	Exón 6	aa sinónimo
11	711G>A	rs 144701102	Exón 6	aa sinónimo
12	727A>G		Exón 6	
13	734G>A	rs 145402040	Exón 6	Gly 245 Asp
14	761C>T		Exón 6	
15	832A>G		Exón 6	
16	841T>G		Exón 6	Región 3' no traducida
17	844G>T	rs 1060314	Exón 6	Región 3' no traducida
18	871C>T		Exón 6	Región 3' no traducida
19	901C>T		Exón 6	Región 3' no traducida

***POLIMORFISMOS DE VN ÚNICO NUCLEÓTIDO (SNP) PREVIAMENTE DESCRITOS***

En nuestra población se identificaron 39 polimorfismos previamente descritos. En la figura 42 se ha representado la localización de los polimorfismos analizados. En un análisis general de los 39 SNP se pudo observar que los 22 polimorfismos estudiados con más detalle en nuestra población consistían en sustituciones de un nucleótido. No se han detectado deleciones, si bien dos de los SNP descritos por Guida (166) fueron inserciones.

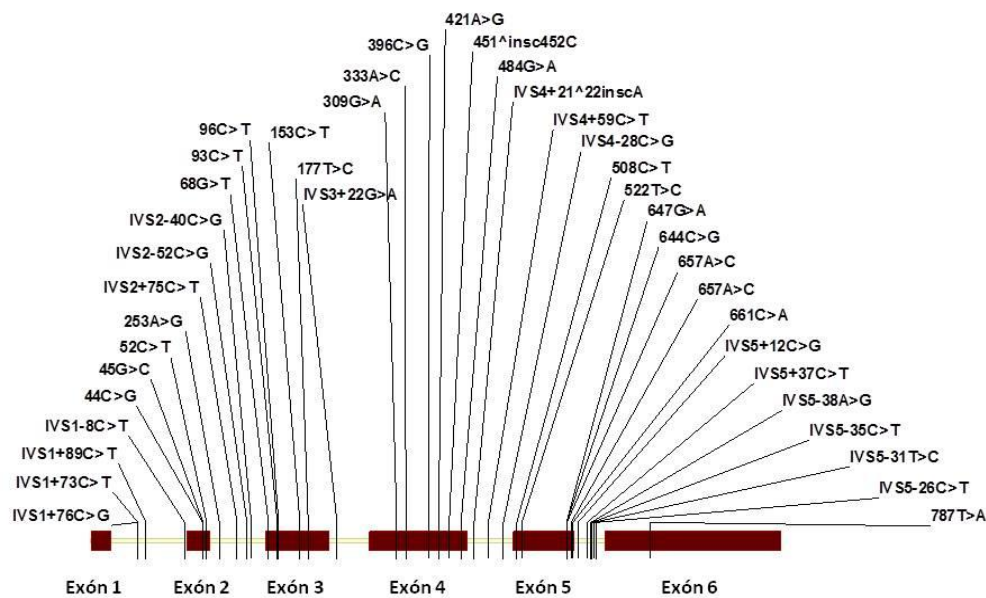
**Tabla 17:** distribución alélica y genotípica de los SNP nuevos en la región comprendida entre el exón 5 y el exón 6.

	Designación del SNP	Distribución Alélica <sup>1</sup>	Distribución genotípica <sup>2</sup>	
			Heterocigosis	Homocigosis
1	613G>A	0,42	0,59	0,12
2	IVS5+23C>A	0,9	-	0,9
3	672C>T	0,25	0,5	-
4	711G>A	0,26	0,52	-
5	734G>A	0,24	0,48	-
6	841T>G	0,7	0,61	0,39
7	844G>T	0,78	0,45	0,55

<sup>1</sup>: Distribución alélica del alelo mutado en tanto por ciento.

<sup>2</sup>: Distribución genotípica del alelo mutado en tanto por ciento.

De todos los SNP analizados en la primera región (numerados del 1 al 11), en 4 de ellos se detectaron variantes génicas: IVS1-8C>T, 52C>T, 68G>T y 153C>T, el primero localizado en el intrón 1, el segundo en el exón 2, y el tercero y cuarto en el exón 3. Las distribuciones alélicas y genotípicas obtenidas en nuestra población para cada SNP descrito previamente se refleja en la tabla 18.



**Figura 42.** Representación esquemática del gen *TPSAB1* con los SNP descritos por Guidi et al en el año 2000 (2). Los polimorfismos están señalados en sus posiciones concretas. Los exones se representan mediante cajas rojas y, entre ellas, los intrones con una línea más pálida.



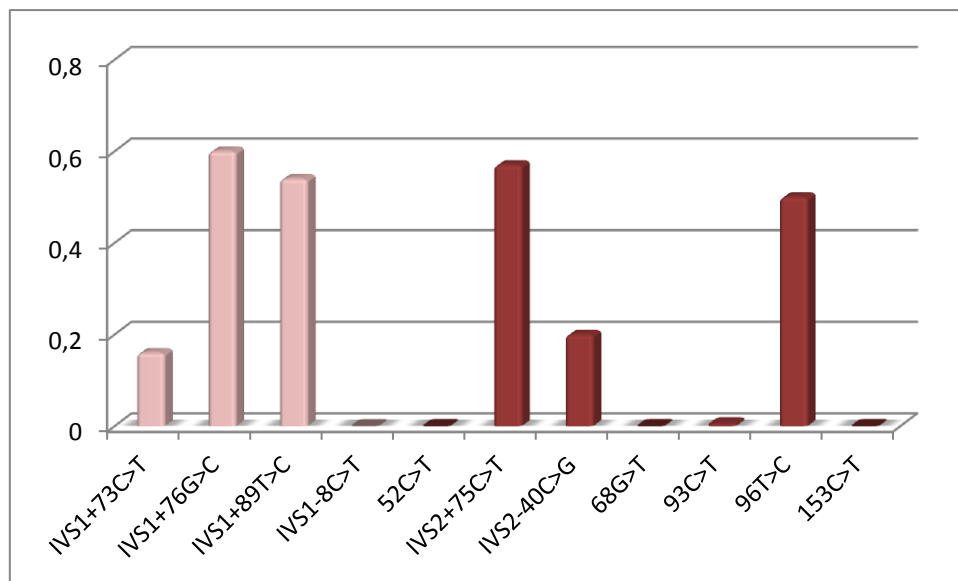
**Tabla 18:** distribución de alelos y genotipos detectados en nuestra población de los SNP previamente descritos.

	Designación del SNP	Distribución Alélica <sup>1</sup>	Distribución genotípica <sup>2</sup>	
			Heterocigoto*	Homocigoto**
1	IVS1+73C>T	0,16	0,32	-
2	IVS1+76G>C	0,60	0,41	0,4
3	IVS1+89T>C	0,54	0,5	0,29
4	IVS1-8C>T	-	-	-
5	52C>T	-	-	-
6	IVS2+75C>T	0,57	0,44	0,35
7	IVS2-40C>G	0,2	0,26	0,06
8	68G>T	-	-	-
9	93C>T	0,006	0,01	-
10	96T>C	0,5	0,52	0,23
11	153C>T	-	-	-
12	522T>C	-	-	-
13	644C>G	0,14	0,27	-
14	647G>A	0,18	0,37	-
15	657A>C	-	-	-
16	661C>A	0,14	0,29	-
17	IVS5+12C>G	0,88	0,04	0,86
18	IVS5+37C>T	0,72	0,41	0,52
19	IVS5-38A>G	0,5	1	-
20	IVS5-35C>T	0,18	0,36	-
21	IVS5-31T>G	0,05	0,11	-
22	IVS5-26C>T	0,18	0,36	-

<sup>1</sup>Distribución alélica del alelo mutado<sup>2</sup>Distribución genotípica del alelo mutado

Las mutaciones intrónicas más frecuentes en este primer grupo de polimorfismos fueron IVS1+76G>C (0,60) y IVS2+75C>T (0,57). Se detectó la mutación exónica 96T>C (0,5). Las frecuencias obtenidas se reflejan en la figura 43.

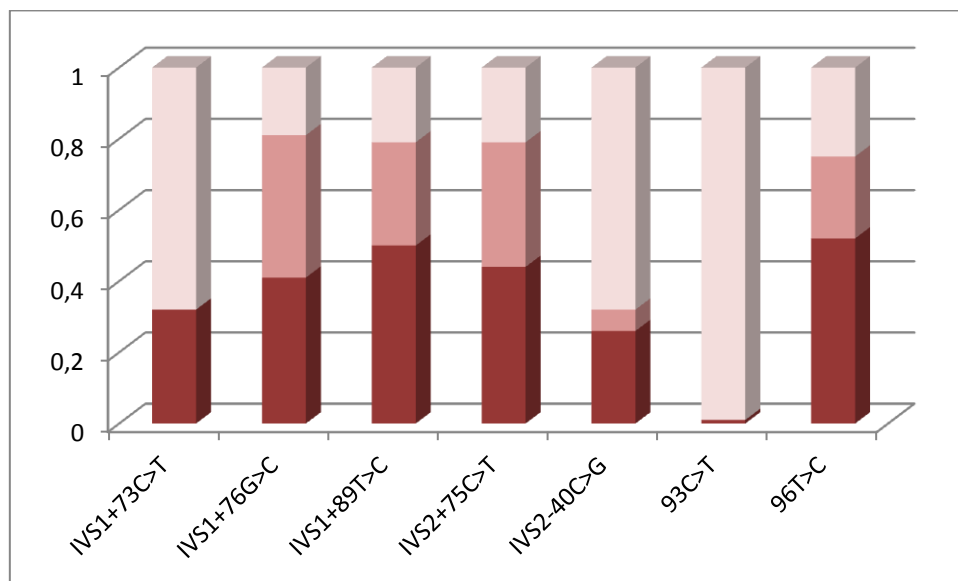
En el segundo grupo de polimorfismos localizados en la región comprendida entre el exón 5 y exón 6, se encontró que seis de estos SNP mostraban una frecuencia del alelo mutado inferior a 0,3: 644C>G y 661C>A presentaban una frecuencia de 0,14, y 647G>A, IVS5+35C>T, e IVS5-26C>T, una frecuencia de 0,18. Por otra parte, IVS5-31T>G se encontró con una baja frecuencia (0,05) y el polimorfismo 657A>C no se encontró en nuestra muestra de individuos.



**Figura 43.** Distribución del alelo mutado de cada uno de los SNP estudiados en la región comprendida entre el exón 1 y el exón 2 del gen. En rosa se colorea la frecuencia de los polimorfismos correspondientes a los intrones y en rojo las correspondientes a los exones.

Todos estos polimorfismos fueron estudiados en nuestra muestra y comparados con población caucásica americana, de acuerdo con la bibliografía disponible, así como con las frecuencias anotadas en las bases de datos de poblaciones europeas (<http://genome.ucsc.edu/>).

En la figura 44 se observa la distribución de las frecuencias genotípicas de los SNP analizados en nuestra población control en la región comprendida entre el exón 1 y exón 2. Para los polimorfismos IVS1+73C>T y 93C>T, representados en primer y noveno lugar, no se han detectado individuos homocigotos.



**Figura 44.** Frecuencias genotípicas de los distintos SNP en la región del intrón 1 y exón 2, en degradación de color, en color vino se representa la frecuencia de individuos con la mutación en heterocigosis y en color rosa, los individuos con el polimorfismo en homocigosis. En color claro se representa la frecuencia de individuos homocigotos para el alelo normal.

En la segunda región de estudio se han analizado once SNP, cuatro de ellos localizados en una región de 20 pb en el exón 5, mientras que el resto se encontraba ampliamente repartido a lo largo de esta región. Estos fueron estudiados en individuos control, de manera que pudieron establecerse las distribuciones alélicas y genotípicas. Además, de todos ellos, únicamente 5 se encuentran anotados en las bases de datos por lo que se les ha asignado el rs.

**Tabla 19:** polimorfismos de un único nucleótido previamente descritos en la región comprendida entre el exón 5 y el exón 6.

	Designación del SNP	rs	Localización en el gen	Efecto en proteína
1	522T>C	rs 200171211	Exón 5	aa sinónimo
2	644C>G	rs 202246813	Exón 5	Thr 215 Ser
3	647G>A	rs 200303851	Exón 5	Arg 216 Gln
4	657A>C		Exón 5	
5	661C>A	rs 201192435	Exón 5	Gln 221 Lys
6	IVS5+12C>G	rs 199639987	Intrón 5	Intrón
7	IVS5+37C>T		Intrón 5	Intrón
8	IVS5-38A>G		Intrón 5	Intrón
9	IVS5-35C>T		Intrón 5	Intrón
10	IVS5-31T>G		Intrón 5	Intrón
11	IVS5-26C>T		Intrón 5	Intrón

Los SNP descritos previamente en la literatura en la región de interés por su alto grado de polimorfismos (exón 5- exón 6) y estudiados en nuestra población son sustituciones de un aminoácido por otro (tabla 19). Aunque algunos de estos SNP tenían asignado rs no habían sido previamente analizados en ningún grupo de pacientes.

### 5.2.2.~ ESTUDIO DE HAPLOTIPOS

El estudio de haplotipos permite la comprensión de la distribución de los alelos basándose en algoritmos predictivos.

**Tabla 20:** combinaciones obtenidas por el software SNPalyzer, utilizando los algoritmos EM, Clark y pseudo-Gibbs.

Algoritmo	Combinación	Frecuencia	Identificación*
EM	CAGACAGATGTGTTAAGT	0,59	H1
	TGCGACGACACTCCGGTG	0,20	H7
	TGCGACGACACTCCGATG	0,04	H4
	TGCGACCCCACTCCGGTG	0,04	H5
	TGCGACGACATGTTAAGT	0,04	H6
	TAGACAGATGTGTTAAGT	0,04	H2
	TGCGCCGACACTCCGGTG	0,04	H3
Clark	CAGACAGATGTGTTAAGT	0,59	H1
	TGCGACGACACTCCGGTG	0,04	H7
	TGCGACGACACTCCGATG	0,04	H6
	TGCGACGACACTCCGGTG	0,18	H4
	TGCGACCCCACTCCGGTG	0,04	H5
	TAGACAGATGTGTTAAGT	0,04	H2
	TGCGCCGACACTCCGGTG	0,04	H3
PseudoGibbs	CAGACAGATGTGTTAAGT	0,59	H1
	TGCGACGACACTCCGGTG	0,18	H7
	TGCGACGACATGTTAAGT	0,04	H6
	TGCGACGACACTCCGATG	0,04	H4
	TGCACCCCACTCCGGTG	0,04	H5
	TAGACAGATGTGTTAAGT	0,04	H2
	TGCGCCGACACTCCGGTG	0,04	H3

\*Identificación de los haplotipos obtenidos por clonación

El análisis de haplotipos se llevó a cabo incluyendo ambos tipos de SNP, es decir, los descritos previamente y los descritos *de novo*. La combinación de 18 SNP de la región más polimorfa proporcionó un total de 21 haplotipos, obtenidos con los algoritmos EM, Clark y pseudo-Gibbs (PGS) (Tabla 20). Para confirmar la correcta

caracterización, se clonaron tres muestras representativas del grupo control a partir de los fragmentos de PCR. Se confirmaron siete secuencias obtenidas con el *SNP analyzer* (H1-H7) y se obtuvo otra nueva combinación (H8). Este haplotipo no había sido detectado con los algoritmos teóricos.

Los resultados se muestran en la tabla 21.

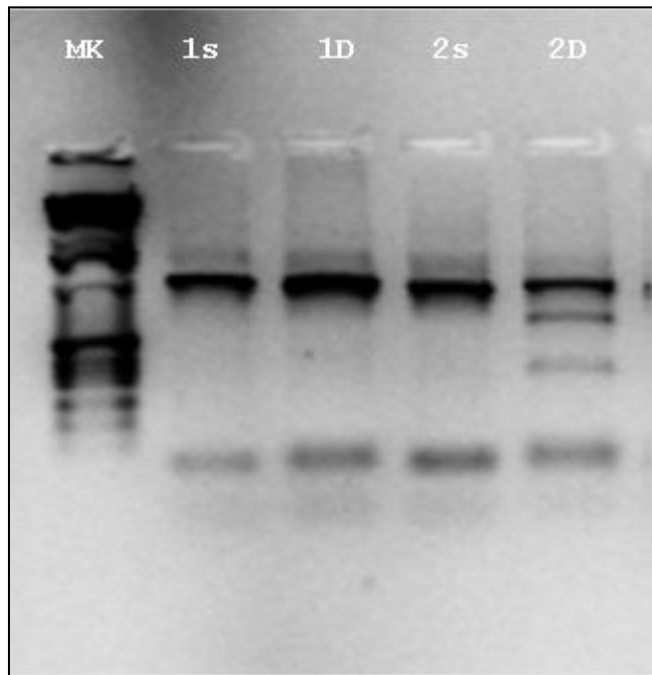
**Tabla 21:** combinación de haplotipos obtenidos por clonación de los amplicones de PCR previos a la secuenciación

	522T>C	613G>A*	644C>G	647G>A	657A>C	661C>A	IVS5+12C>G	IVS5+23C>A*	IVS5+37C>T	IVS5-38A>G	IVS5-35C>T	IVS5-31T>G	IVS5-26C>T	672C>T*	711G>A*	734G>A*	841T>G*	844G>T*
H1	C	A	G	A	C	A	G	A	T	G	T	G	T	T	A	A	G	T
H2	T	A	G	A	C	A	G	A	T	G	T	G	T	T	A	A	G	T
H3	T	G	C	G	G	C	G	A	C	A	C	T	C	C	G	G	T	G
H4	T	G	C	G	A	C	G	A	C	A	C	T	C	C	G	A	T	G
H5	T	G	C	G	A	C	C	C	C	A	C	T	C	C	G	G	T	G
H6	T	G	C	G	A	C	G	A	C	A	T	G	T	T	A	A	G	T
H7	T	G	C	G	A	C	G	A	C	A	C	T	C	C	G	G	T	G
H8	C	A	C	G	A	C	G	A	T	G	T	G	T	T	A	A	G	T

\* Nuevos SNP descritos en nuestro estudio

### 5.2.3. ANÁLISIS DE RFLP

Para completar el análisis genético, se llevó a cabo un análisis de RFLP (Polimorfismos de los Fragmento de Restricción) (figura 45). Se ha descrito que una forma de identificar la forma alfa de la triptasa es mediante el estudio de un RFLP reconocido por la enzima *EcoRV*. La distribución en la población total se representa en la figura 46. Se observa que más de la mitad de toda la población de estudio presentaba el sitio de restricción descrito para la enzima *EcoRV*.



**Figura 45.** Electroforesis tras digestión con *EcoRV*. MK: marcador de tamaño, S: muestras sin digerir, D: muestras digeridas. 1D: se observan una banda, por lo que el genotipo establecido para estos individuos carece de la forma alfa; 2D: el resultado de la digestión proporcionó tres bandas, por lo que su genotipo se define como portador de la forma alfa.

En la muestra de estudio el 39,5 % de individuos no presentaba la forma  $\alpha$  frente al 60,5 % que sí la presentaba. Los resultados para cada uno de los grupos se reflejan en la tabla 22.

**Tabla 22:** proporciones de los individuos del total de la población de estudio (pacientes y controles) que presentaban cada uno de los genotipos determinados por estudios de RFLP con la enzima de restricción EcoRV.

	Resultado digestión EcoRV		Total
	Presencia de $\alpha$	Ausencia de $\alpha$	
<b>Controles</b>	84 (0,62)	51 (0,38)	135
<b>Pacientes</b>	98 (0,59)	69 (0,41)	167
<b>Total</b>	182 (0,60)	120 (0,40)	302

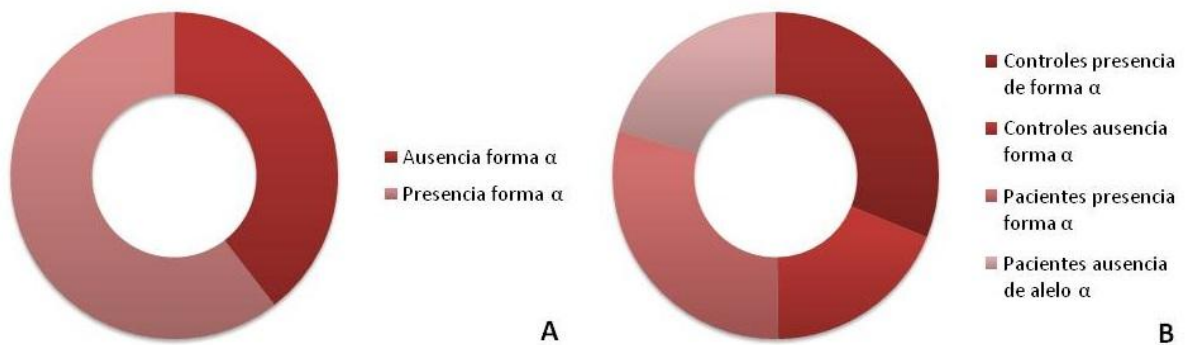
En nuestra población no se ha observado una asociación estadísticamente significativa entre pacientes y controles en relación con la distribución de la forma alfa, que fue detectada en el 59 % de los pacientes con asma comparados con el 62 % del grupo control.

**Tabla 23:** media de los niveles de triptasa, niveles de IgE, del logaritmo de IgE y p de Fisher respecto a la distribución alélica.

	Presencia de $\alpha$	Ausencia de $\alpha$	p
<b>Triptasa ( <math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	4,59 $\pm$ 2,24	4,95 $\pm$ 2,09	0,29
<b>IgE (kU/L)</b>	303,39 $\pm$ 566,58	240,95 $\pm$ 481,13	0,325
<b>logIgE</b>	1,97 $\pm$ 0,69	1,87 $\pm$ 0,69	0,21



Este método no permite distinguir entre la forma  $\alpha$  en homocigosidad o heterocigosidad. En el análisis de asociación entre el SNP 363C>T (EcoRV RFLP) y diferentes características clínico-biológicas, niveles de IgE y niveles de triptasa, no se encontró asociación entre el polimorfismo y las características analizadas, aunque se encontró un nivel inferior de triptasa sérica  $4,59 \pm 2,24 \mu\text{g/L}$  frente a  $4,95 \pm 2,09 \mu\text{g/L}$ , en los portadores de la forma  $\alpha$ .



**Figura 46. A:** proporción encontrada en la población de estudio del RFLP. En rosa se representa la proporción de la población que presenta el sitio de restricción reconocido por la enzima EcoRV, mientras que en rojo se representa la proporción de la población que no presenta dicho sitio. **B:** distribución de los individuos atendiendo al genotipo y al grupo de pertenencia.

Entre las características clínico-biológicas analizadas, tabla 23, se estudiaron las pruebas cutáneas frente a distintos aeroalérgenos, epitelios, ácaros, hongos y pólenes, cuyos resultados se muestran en la tabla 24.

**Tabla 24:** distribución alélica respecto a los resultados de pruebas cutáneas positivas frente a los distintos aeroalérgenos estudiados.

Aeroalérgenos	Presencia de la forma $\alpha$	Ausencia de la forma $\alpha$
Ácaros	0,65	0,35
Epitelios	0,62	0,38
Pólenes	0,60	0,40
Hongos	0,68	0,32

También se estudiaron las posibles diferencias entre el grupo control y el de los pacientes en relación a la presencia o ausencia de la forma  $\alpha$  atendiendo a los niveles de triptasa; en ambos grupos, los individuos portadores de la forma  $\alpha$  presentaron niveles más bajos de triptasa que los no portadores, si bien las diferencias no resultaron estadísticamente significativas (tabla 25).

**Tabla 25:** niveles de triptasa ( $\mu\text{g/L}$ ) en pacientes y controles de acuerdo a la distribución de la forma  $\alpha$

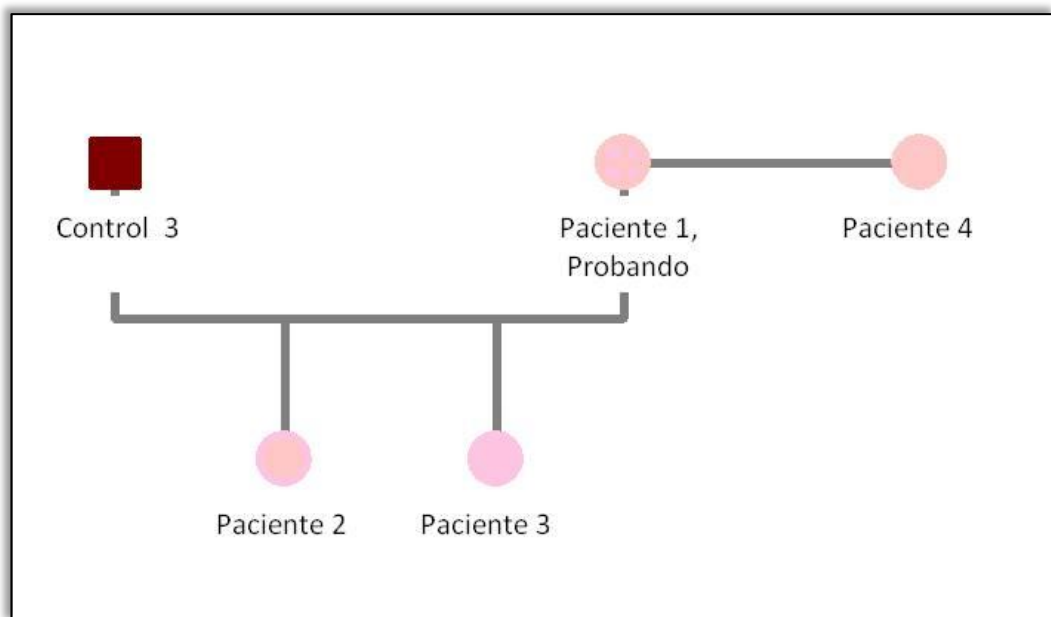
	Presencia de $\alpha$ *	Ausencia de $\alpha$	Total
<b>Controles</b>	4,77 $\pm$ 2,17	4,82 $\pm$ 2,06	<b>4,79 <math>\pm</math> 2,11</b>
<b>Pacientes</b>	4,45 $\pm$ 2,31	5,07 $\pm$ 2,13	<b>4,70 <math>\pm</math> 2,25</b>
<b>Total</b>	4,59 $\pm$ 2,24	4,95 $\pm$ 2,09	<b>4,74 <math>\pm</math> 2,18</b>

\* forma  $\alpha$ : incluye genotipos homocigotos y heterocigotos.

### 5.3.~ ESTUDIO GENÉTICO EN INDIVIDUOS CON NIVELES ELEVADOS DE TRIPTASA.

En la práctica clínica del Servicio de Inmunoalergia se identificó una familia (figura 47) en la que varios miembros presentaban niveles elevados de triptasa. Se

procedió al estudio de la región promotora del gen, tanto en estos pacientes como en individuos control. Estos individuos tenían un estudio alérgico negativo. Posteriormente se procedió al estudio de la región codificante así como al análisis de expresión de ARN en dichos pacientes.



**Figura 47.** Árbol genealógico que muestra la relación de parentesco entre los individuos incluidos en esta parte del estudio.

### 5.3.1.~ ESTUDIO DE LA REGIÓN PROMOTORA

#### *MODIFICACIONES EN LOS PROMOTORES DEL GRUPO DE ESTUDIO.*

El análisis de las secuencias del promotor y su alineamiento ha permitido detectar distintas posiciones diferenciales entre los distintos miembros de la familia y, además, con los controles.

Debido a las características particulares de la paciente con niveles elevados de triptasa mantenidos en el tiempo (paciente 1) se analizaron de manera exhaustiva los SNP que se localizaron en la región promotora. Los nuevos SNP descritos se recogen en la tabla 26; en ella se compara el genotipo de la paciente con el resto de pacientes y con el de un individuo control.

### *ANÁLISIS IN SILICO DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN QUE SE VNIRÁN A LA REGIÓN PROMOTORA.*

El estudio *in silico* permite predecir qué factores de transcripción tendrán capacidad de unirse o carecerán de esta capacidad en cada una de las posiciones diferentes detectadas.

Se realizó un estudio de la modificación de los patrones de unión de los factores de transcripción en función de los SNP localizados en la región promotora. En la tabla 27 se muestran los factores de transcripción que tienen capacidad de unir (ganancia) y los que no (pérdida) en función de las variantes génicas identificadas en el promotor.

**Tabla 26:** nuevos SNP hallados en la paciente y comparación con el resto de pacientes y grupo control.

Designación del SNP	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Control
-693A>G	AG	AA	AA	AA	AA
-612T>C	TC	TT	TT	TT	TT
-475T>C	TC	TT	TT	TT	TT
-454G>T	GT	GG	GG	GG	GG
-449C>T	CT	CC	CC	CC	CC
-447G>T	GT	CC	CC	CC	GG
-401T>C	TC	TT	TT	TT	TT
-209T>G	TG	TG	TT	TT	TT
-130C>A	CA	CC	CC	CC	CC

**Tabla 27:** patrones diferenciales de acuerdo con los sitios polimórficos en la región promotora y los polimorfismos de esta región característicos de la paciente 1.

	<b>Factor de transcripción</b>	<b>Paciente 1</b>	<b>Paciente 2</b>	<b>Paciente 3</b>	<b>Controles</b>
<b>-768</b>	<i>MITF</i>	✓✓	✓	✓	✓
	E-box binding factors	⊘	⊘	✓	✓
<b>-768, -760</b>	<i>HIF, bHLH/PAS</i> protein family	⊘	✓	✓	✓
<b>-768, -760, -757</b>	<i>AHR</i>	✓✓	✓	✓	✓
	<i>CREB</i>	✓✓	✓	✓	✓
<b>-731</b>	<i>NRF1</i>	✓✓	✓	✓	✓
	<i>E2F-myc</i> activator	✓✓	✓	✓	✓
	Carbohydrate response elements	✓✓	✓	✓	✓
	<i>C2H2</i> zinc finger transcription fc2	✓✓	✓	✓	✓
<b>-704</b>	<i>EGR/NGF</i> induced protein C	⊘	✓	✓	✓
	<i>MAZ</i>	⊘	✓	✓	✓
<b>-693A&gt;G<sup>1</sup></b>	<i>SIX4</i>	✓	⊘	⊘	⊘
	<i>TP53</i>	✓	⊘	⊘	⊘
<b>-648</b>	“negative” glucocorticoid response elements	✓✓	✓	✓	✓
<b>-620</b>	<i>KLF</i>	✓✓	✓	✓	✓
	Testis-specific <i>bHLH</i> -Zip transcription factors	✓✓	✓	✓	✓
	E-box binding factors	✓✓	✓	✓	✓
<b>-612T&gt;C<sup>1</sup></b>	<i>TFAP2A</i>	✓	⊘	⊘	⊘
	PSE of RNA polymerase II-transcribed snRNA genes	✓	⊘	⊘	⊘
<b>-567</b>	Activator protein 2	⊘	✓	✓	✓
<b>-472</b>	<i>PAX-4/PAX-6</i>	⊘	✓	✓	✓
<b>-454G&gt;T<sup>1</sup></b>	<i>ATOH1, HATH1, MATH-1</i>	⊘	✓	✓	✓
	<i>MyoD (myf3)</i>	⊘	✓	✓	✓
<b>-449C&gt;T<sup>1</sup></b> <b>-447G&gt;T<sup>1</sup></b>	<i>Meis1a</i>	⊘	✓	✓	✓
	<i>MyoD (myf3)</i>	⊘	✓	✓	✓
<b>-401T&gt;C<sup>1</sup></b>	<i>ATOH1, HATH1, MATH-1</i>	⊘	✓	✓	✓
	<i>TP53</i>	✓	⊘	⊘	⊘
<b>-263</b>	<i>SRF</i>	✓✓	✓	✓	✓
	<i>EVI-1</i> myeloid transforming protein	⊘	✓	✓	✓
	<i>HOX-PBX</i> complexes	⊘	✓	✓	✓
<b>-130C&gt;A<sup>1</sup></b>	<i>PAX6</i>	⊘	✓	✓	✓

✓ Positive binding site ⊘ Negative binding site <sup>1</sup> Polimorfismos característicos descritos en la paciente 1.

En el estudio del promotor de la paciente 1, se ha detectado un patrón claramente diferencial en relación no sólo con los controles sino también con las dos hijas. De hecho el patrón de unión de las hijas es muy similar al de los controles excepto por algunas posiciones puntuales.

Merece la pena destacar el caso del factor *MITF*, para el que la paciente presenta mayor capacidad de unión con respecto al resto de individuos. Por el contrario, los factores *E box binding factors*, *MAZ*, *Activator Protein 2* o *MyoD* no fueron capaces de unirse a la región del promotor de la paciente 1. Uno de los SNP descritos en este trabajo como diferenciador de esta paciente permite la unión del factor *SIX4* y *TP53*, que no son capaces de unirse al promotor del resto de individuos en esa posición.

De manera análoga al resto del promotor se analizaron los SNP individuales que presentaban las **hijas** (paciente 2 y paciente 3) de la paciente. Se ha detectado una diferencia fundamental entre ambas en la posición -768. Por otra parte, al igual que ocurre en la madre ninguna de las dos hijas podrá unir el factor *PAX-4/PAX-6*, en la posición -472. Además, en una de ellas, la paciente 2 se observó que compartía con la madre el SNP -209T>G con la madre en su secuencia.

En el caso de la hermana de la paciente 1 (paciente 4), recogida en nuestra serie como paciente 4, con niveles elevados de triptasa y sin ninguna sintomatología, también se identificaron en la secuencia del promotor una serie de SNP (tabla 28). Dos de ellos capaces de unir factores distintos a los que une la secuencia consenso: -688T>C podrá unir *TP53*, *ZKSCAN3* y *CPBP*; el SNP -551G>A podrá unir: *Upstream stimulating factor 1/2*, *Basic hélix-loop-helix protein known as*

*Dec2 or Sharp2, DNA binding site for NEUROD1 (BETA-27/ E47 dimer), Constitutive androstane receptor/ retinoid X receptor heterodimer, DR4 sites, CTCF y CP2.*

### 5.3.2.~ ESTUDIO DE LA REGIÓN GENÓMICA DEL GEN *TPSAB1* EN LA FAMILIA CON NIVELES ELEVADOS DE TRIPTASA

En este estudio se procedió al análisis del gen *TPSAB1*, para lo que se analizaron las regiones exónicas e intrónicas del gen en los pacientes con relación familiar y niveles elevados de triptasa mantenidos en el tiempo. Los resultados obtenidos en la familia de estudio fueron comparados con un grupo control con niveles normales de triptasa sérica.

**Tabla 28:** SNP descritos en la paciente que determinan la pérdida de la capacidad de unión de estos factores de transcripción.

Nomenclatura SNP	Factor de transcripción
516A>G	CTF1
	Zebrafish PAX9 binding sites
	KLF6
-398A>G	---
-274T>C	Kruppel-like zinc finger protein 219
	SRF
-162A>G	B-cell-specific activator protein
-142A>G	---
-105C>A	LBP32, MGR, TFCP2L2
-66T>C	C2H2 zinc finger transcription factor 2

### ANÁLISIS COMPLETO DEL GEN *TPSAB1* POR SECUENCIACIÓN

Al plantear el estudio se decidió realizar una secuenciación y análisis previo completo del gen *TPSAB1* en la familia del estudio (madre y sus dos hijas) y tres

controles seleccionados aleatoriamente, entre todos los individuos del grupo control del estudio.

Estos 49 polimorfismos han sido identificados en la familia de estudio, siendo 4 de ellos exclusivos de la misma (IVS1+89T>C, 96T>C, IVS1+106C>A y IVS4-39G>T). Dichos SNP se reflejan en la tabla 29.



**Tabla 29:** SNP descritos en el análisis completo del gen *TPSAB1* en la familia de estudio.

	Nomenclatura SNP	rs	Localización	Efecto en la proteína
1	IVS1+73C>T	rs 1800981	Intrón 1	Intrón
2	IVS1+76G>C	rs 1800982	Intrón 1	Intrón
3	IVS1+89T>C	rs 760212, rs 78683985	Intrón 1	Intrón
4	IVS1+106C>A		Intrón 1	Intrón
5	IVS1-8C>T	rs 1800983	Intrón 1	Intrón
6	44C>G		Exón 2	Pro15Arg
7	45G>C		Exón 2	Pro 15 Arg
8	52C>T	rs 61739899	Exon 2	Ala 17 Val
9	IVS2+75C>T	rs 2234654	Intrón 2	Intrón
10	IVS2+76C>T	rs 71380253	Intrón 2	Intrón
11	IVS2-52C>G		Intrón 2	Intrón
12	IVS2-40C>G	rs 28580251,rs 1800985	Intrón 2	Intrón
13	68G>T	rs 141519544 rs 1141965	Exón 3	Gly 23 Val
14	83G>A	rs 146223687	Exón 3	Gln 28 Arg
15	86T>C	rs 112944038	Exón 3	Ala 29 Val
16	90C>T	rs 112531166	Exón 3	Gly 30 Gly
17	93C>T	rs 1800987	Exon 3	aa sinónimo
18	96T>C		Exón 3	aa sinónimo
19	152A>G	rs 150845192	Exón 3	Arg 51 His
20	153C>T	rs 1800989	Exon 3	aa sinónimo
21	155G>A	rs 17841227	Exón 3	Asp 52 Gly
22	158C>G	rs 17841226	Exón 3	Arg 53 Pro
23	177T>C		Exón 3	
24	216A>G	rs 201558970	Exón 3	Ala 72 Ala
25	226G>C	rs 151324823	Exón 3	Leu 76 Val
26	IVS3+22G>A		Intrón 3	Intrón
27	IVS3+30G>C		Intrón 3	Intrón
28	253A>G		Exón 4	Thr 85 Ala
29	309G>A		Exón 4	aa sinónimos
30	333A>C		Exón 4	aa sinónimos
31	344C>T	rs 199625169	Exón 4	Ile 115 Thr
32	346G>A		Exón 4	
33	347C>T	rs 143043553	Exón 4	Val 116 Ala
34	353T>C	rs 202044288	Exón 4	Thr 118 Ile
35	354C>T		Exón 4	
36	363C>T	rs 200053482	Exón 4	
37	390G>C	rs 201278990	Exón 4	
38	396C>G	rs 1800991	Exon 4	Asn 132 Lys
39	397G>A	rs 200334042	Exón 4	
40	421A>G	rs 1800992	Exon 4	Thr 140 Ala
41	422C>T		Exón 4	
42	423C>G		Exón 4	
43	438A>G	rs 201223167	Exón 4	aa sinónimo
44	451^452insC	rs 2234647	Exon 4	Cambio marco lectura
45	484G>A	rs 2234641	Exon 4	Asp 161 Asn
46	IVS4+21^+22insA	rs 2234642	Intrón 4	Intrón
47	IVS4+59C>T	rs 2234643	Intrón 4	Intrón
48	IVS4-39G>T		Intrón 4	Intrón
49	IVS4-28C>G		Intrón 4	Intrón

De los 49 SNP estudiados, 34 de ellos se localizaban en regiones exónicas, de modo que para 19 de ellos se ha descrito su efecto en la proteína traducida, suponiendo una modificación de un aminoácido por otro, y, en 6 de ellos, el SNP da lugar a un mismo aminoácido.

**Tabla 30:** genotipo de la familia de estudio para los SNP y polimorfismos previamente descritos estudiados en el gen *TPSAB1*.

	Nomenclatura SNP	Madre	Hija 1	Hija 2	Frecuencia*
1	508C>T	CC	CC	CC	-
2	522T>C	CC	CC	CC	-
3	613 G>A <sup>1</sup>	AA	AA	AG	0,42
4	644C>G	GG	GG	CG	0,14
5	647G>A	AA	AA	AA	0,14
6	657A>C	CC	CC	AC	-
7	661C>A	AA	AA	AA	0,14
8	IVS5+12C>G	GG	GG	GG	0,8
9	IVS5+23C>A <sup>1</sup>	AA	AA	AA	0,9
10	IVS5+37C>T	TT	TT	TT	0,72
11	IVS5-38A>G	GG	GG	GG	0,5
12	IVS5-35C>T	TT	TT	TT	0,18
13	IVS-31T>G	GG	GG	GG	0,05
14	IVS5-26C>T	TT	TT	TT	0,18
15	672C>T <sup>1</sup>	TT	TT	TT	0,25
16	711G>A <sup>1</sup>	AA	AA	AA	0,26
17	734G>A <sup>1</sup>	AA	AA	AA	0,24
18	787T>A	TT	TT	TT	-
19	841T>G <sup>1</sup>	GG	GG	GG	0,7
20	844G>T <sup>1</sup>	TT	TT	TT	0,78

\*Frecuencia del alelo mutado en el grupo control

<sup>1</sup>: nuevos SNP descritos en este trabajo

**ANÁLISIS DE LA REGIÓN COMPRENDIDA ENTRE EL EXÓN 5 Y EL EXÓN 6.****Nuevos SNP estudiados en la familia**

Se estudiaron siete nuevos polimorfismos en la familia y se compararon con los obtenidos en la población control previamente analizada; todos ellos estaban localizados en la región comprendida entre el exón 5 y el exón 6 del gen *TPSAB1*. Estos resultados se reflejan en la tabla 30.

**Tabla 31:** posición, rs y localización de los nuevos SNP estudiados en la región del exón 5 y 6 del gen *TPSAB1*.

Posición en el gen	Nomenclatura SNP	Localización	Efecto en la proteína	DB-SNP
1291835	508C>T	Exón 5	Pro 170 Ser	
1291850	522T>C	Exón 5	aa sinónimo	rs 1141970
1291941	613 G>A	Exón 5	Val 204 Ile	rs 1060284
1291972	644C>G	Exón 5	Thr 215 Ser	rs 2234905
1291975	647G>A	Exón 5	Arg 216 Gln	rs 2234906
1291985	657A>C	Exón 5	aa sinónimo	rs 2234907
1291989	661C>A	Exón 5	Gln 221 Lys	rs 17841224
1292003	IVS5+12C>G	Intrón 5	Intrón	rs 2234645
1292021	IVS5+23C>A	Intrón 5	Intrón	rs 71380254
1292028	IVS5+37C>T	Intron 5	Intrón	rs 2234657
1292039	IVS5-38A>G	Intrón 5	Intrón	rs 2234658
1292042	IVS5-35C>T	Intron 5	Intrón	rs 2234659
1292046	IVS-31T>G	Intrón 5	Intrón	rs 2234660
1292051	IVS5-26C>T	Intron 5	Intrón	rs 2234661
1292085	672C>T	Exón 6	aa sinónimo	rs 1137383
1292124	711G>A	Exon 6	aa sinónimo	rs 1060290
1292147	734G>A	Exón 6	Gly 245 Asp	rs 1060292
1292177	787T>A	Exón 6	Tyr 263 Asn	-
1292254	841T>G	Exón 6	Región 3' no traducida	rs 1060314
1292257	844G>T	Exón 6	Región 3' no traducida	rs 17135220

En la columna de la derecha se indica la frecuencia del alelo mutado encontrado en la muestra control estudiada.

De igual manera que para los SNP previamente descritos en la literatura, su efecto en la proteína que codifican se recogen en la tabla 31.

### Polimorfismos de un único nucleótido descritos previamente

En la tabla 30, también, se muestran los genotipos de la familia estudiada para los SNP previamente descritos para este gen.

Es destacable que la primera paciente (madre, probando) es homocigota para todos los SNP.

### ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS

El análisis de haplotipos en el probando de este estudio, tanto para los SNP publicados por Guida y cols, 2000 (156), como los descritos en este trabajo, se realizó mediante la plataforma informática *SNP analyzer*. Los SNP se han agrupado por proximidad, incluyendolos en el análisis. En el estudio realizado con el programa se han empleado tres algoritmos, EM, Gibbs y Clark (160).

**Tabla 32:** haplotipos más comunes obtenidos en el probando del estudio frente al grupo control.

	613G>A*	644C>G	647G>A	657A>C	661C>A	IVS5+12C>G	IVS5+23C>A*	IVS5+37C>T	IVS-38A>G	IVS5-35C>T	IVS5-31T>G	IVS5-26C>T	672C>T*	711G>A*	734G>A*	841T>G*	844G>T*
Ho <sup>a</sup>	A	G	A	C	A	G	A	T	G	T	G	T	T	A	A	G	T
H1 <sup>a</sup>	A	G	A	C	A	G	A	T	G	T	G	T	T	A	A	G	T
Ho <sup>b</sup>	A	C	G	A	C	G	A	T	A	C	T	C	C	G	G	G	T
H1 <sup>b</sup>	A	C	G	A	C	G	A	T	G	C	T	C	C	G	G	G	T

<sup>a</sup> Haplotipos más comunes obtenidos en el probando del estudio

<sup>b</sup> Haplotipos más comunes obtenidos en el grupo control.

\* Nuevos SNP descritos en el grupo de pacientes estudiados.

El haplotipo de la paciente es completamente diferente de los haplotipos más frecuentes obtenidos en individuos control, tabla 32. Todos los polimorfismos en el haplotipo obtenido eran homocigotos en la paciente.

#### **5.4.~ ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN *TPSAB1*.**

Un aspecto fundamental del análisis molecular del gen *TPSAB1* consistió en realizar el análisis del ADNc obtenido tras la retrotranscripción del ARN procedente de la sangre total de cada uno de los individuos incluidos en esta parte de estudio.

Para este análisis, en el grupo de estudio se incluyeron dos pacientes con triptasa elevada, la probando (paciente 1) y su hermana (paciente 4). Además, se incluyeron tres controles con niveles de triptasa inferiores a 11,4 µg/L.

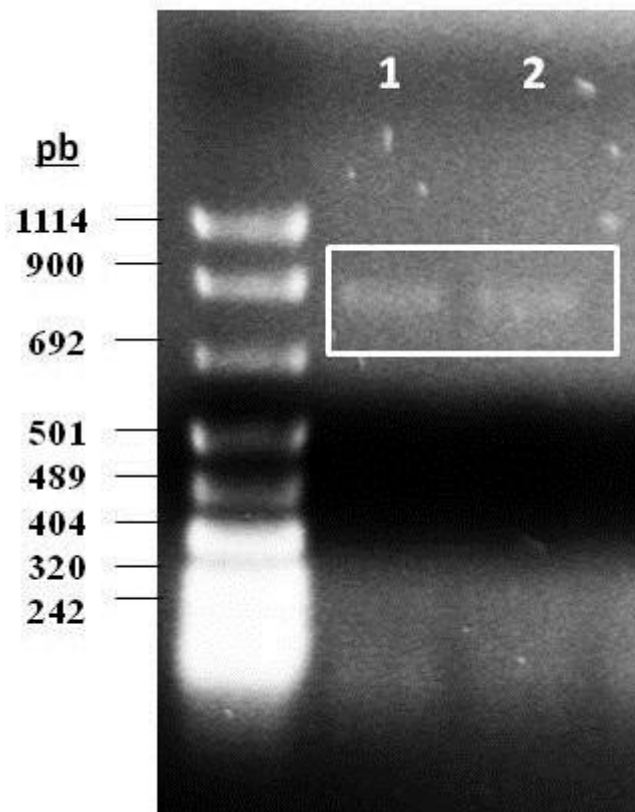
##### **5.4.1.~ ANÁLISIS CUALITATIVO DE EXPRESIÓN**

El ADNc obtenido presentaba una longitud de 828 pares de bases, y comprendía un total de 5 exones, que se corresponden con los exones codificantes del gen, ya que el exón 1 del gen *TPSAB1* se encuentra en sentido 5' del inicio de la transcripción. El primero de ellos (exón 2) constaba de 61 pb; el exón 3, de 172 pb; el exón 4, de 266 pb siendo el más largo; mientras que el exón 5 y el exón 6 se diferenciaban en un nucleótido de longitud, y tenían 164 y 165 pb, respectivamente.

No se obtuvo ninguna diferencia en cuanto al tamaño de los mismos (figura 48).

El análisis de secuenciación del ADNc permitió confirmar las diferencias de genotipado entre la probando y los controles; sin embargo, detectamos algunas

diferencias entre la secuencia genómica y la del ADNc que se comentarán posteriormente en la discusión.



**Figura 48.** Análisis del tamaño de los ADNc del paciente 1 (1) y uno de los controles (2) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

#### 5.4.2.~ ANÁLISIS CVANTITATIVO DE EXPRESIÓN

En esta parte del estudio se comparó la expresión génica en pacientes con niveles elevados de triptasa sérica con controles cuyos niveles de triptasa eran normales. Además, se comparó el ciclo de amplificación de cada individuo con el del gen endógeno *TBP* con el fin de normalizar los niveles de expresión. Finalmente, se

estimó el valor de expresión normalizado. Los resultados medios de cada ciclo de amplificación (Ct) se reflejan en la tabla 33.

**Tabla 33:** datos obtenidos en la amplificación por medio de RT-PCR para el gen endógeno y el gen del estudio.

	Media Ct (TBP)	Desviación Estándar (TBP)	Media Ct (TPS)	Desviación Estándar (TPS)
<b>Paciente 1</b>	26,70	0,09	27,45	0,16
<b>Paciente 4</b>	27,03	0,06	28,70	0,12
<b>Control 1</b>	29,39	0,16	34,23	0,05
<b>Control 2</b>	28,32	0,34	33,71	0,16
<b>Control 3</b>	26,65	0,07	34,25	0,43

Para la comparación de las diferencias en expresión del gen de triptasa, estas fueron calculadas por el método livac. Los resultados se presentan en la tabla 34.

Se observó que la paciente 1 expresaba 34 veces más ARNm del gen de la triptasa que los individuos del grupo control; la paciente 4, 18 veces veces más que la media de controles que ha servido como referencia.

**Tabla 34:** resultados del  $\Delta Ct$  y  $\Delta\Delta Ct$ , así como el número de veces que cada individuo expresa el gen de triptasa con respecto a la referencia de controles tomada.

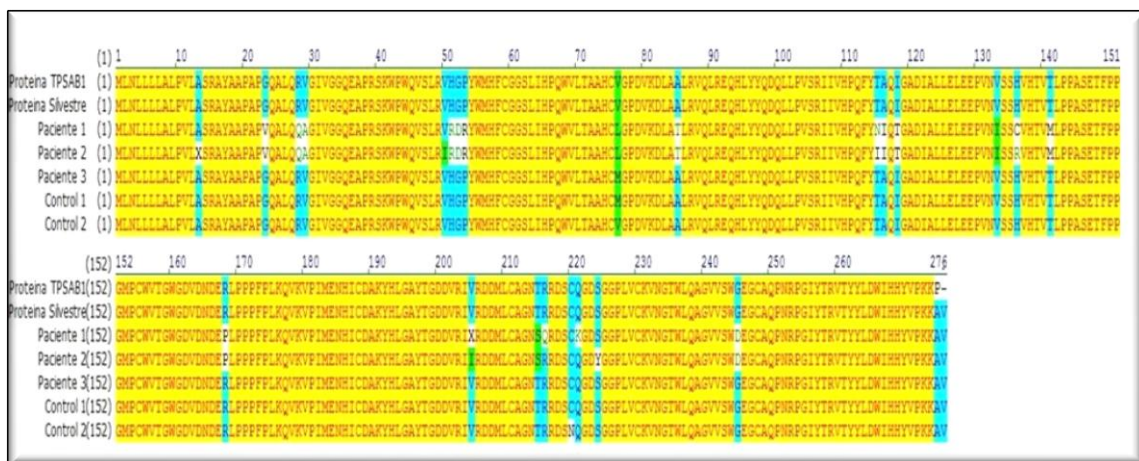
	$Ct_{TPS}-Ct_{TBP}$	$\Delta\Delta Ct$	vs Control	Niveles de triptasa ( $\mu g/L$ )
<b>Paciente 1</b>	0,74	-5,09	<b>33,99</b>	48,15
<b>Paciente 4</b>	1,66	-4,17	<b>17,96</b>	40,6
<b>Control 1</b>	4,84	-0,99	1,99	4,52
<b>Control 2</b>	5,39	-0,44	1,35	5,2
<b>Control 3</b>	7,60	1,76	0,29	4,22

## 5.5.~ ANÁLISIS PROTEICO

Una vez conocidas las modificaciones presentes en la secuencia codificante de los pacientes de estudio, así como de los individuos control analizados, se procedió al estudio de la proteína traducida a partir de dicha secuencia. Esta parte del estudio trata de relacionar las variantes descritas con la repercusión en la proteína codificada. Con el fin de determinar los dominios específicos afectados por los cambios en los aminoácidos codificados, se realizó un análisis proteico.

### 5.5.1.~ ANÁLISIS DEL ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS PROTEICAS

El alineamiento de la secuencia proteica resultante de la traducción de la secuencia codificante de los distintos pacientes y controles se refleja en la figura 49.



**Figura 49.** Alineamiento de las secuencias proteicas de pacientes y controles con las secuencias referencia.

Los cambios principales se clasifican en cambios de aminoácido no polar por aminoácidos ácidos (posiciones 52 y 245) o por básicos (53); modificaciones de



aminoácido básico por polar (28 y 136) y cambios de aminoácidos no polares por polares (85 y 118). Además se ha observado un cambio de aminoácido básico por uno no polar (168) y, por último, un cambio de un aminoácido no polar por otro polar en la posición 141. El resto de modificaciones de un aminoácido por otro son del mismo tipo, cinco sustituciones de aminoácidos no polares por otros no polares (23, 29, 76, 116 y 133), una sustitución de un aminoácido básico por otro básico (51) y una más de un aminoácido polar por otro aminoácido polar (215). Las modificaciones previamente descritas se recogen en la tabla 35.

**Tabla 35:** modificaciones previamente descritas en los aminoácidos y polimorfismo responsable.

SNP responsable del cambio	Posición del aminoácido	Aminoácido Silvestre	Cambio de aminoácido
68G>T	23	Gly	Val
86T>C	28	Arg	Gln
90C>T	29	Val	Ala
152A>G	51	His	Arg
155A>G	52	Gly	Asp
158C>G	53	Pro	Arg
226G>C	76	Val	Leu
253G>A	85	Ala	Thr
346G>A	116	Ala	Ile
353T>C	118	Ile	Thr
397G>A	133	Val	Ile
407A>G	136	His	Cys
422C>T	141	Thr	Met
503G>C	168	Arg	Pro
644C>G	215	Thr	Ser
734G>A	245	Gly	Asp

Además de estas modificaciones en relación a la secuencia de referencia que ya están descritas, se han identificado tres aminoácidos diferenciales en estas posiciones exclusivas de la paciente 1. En las posiciones 115 (desde la metionina

inicial) y 205 los aminoácidos que se describen en la paciente corresponden con una Serina (S) y una Asparragina (N) en lugar de Isoleucina (propio de forma  $\alpha$ ) o Treonina de la forma  $\beta$ . En la posición 205 la paciente presenta Leucina (L) y Fenilalanina (F) en lugar de Valina ( $\beta$ ) o Isoleucina ( $\alpha$ ). Otro de los aminoácidos diferenciales de la paciente 1 da lugar al aminoácido Isoleucina (I).

### **5.5.2.~ ANÁLISIS DE LOS DOMINIOS DE LA PROTEÍNA**

Para el análisis de los dominios proteicos que presenta cada uno de los individuos estudiados se realizó un análisis *in silico* de la proteína obtenida de la traducción de la secuencia codificante.

Las diferencias entre la paciente 1 y el resto de individuos control se refleja en la tabla 36.

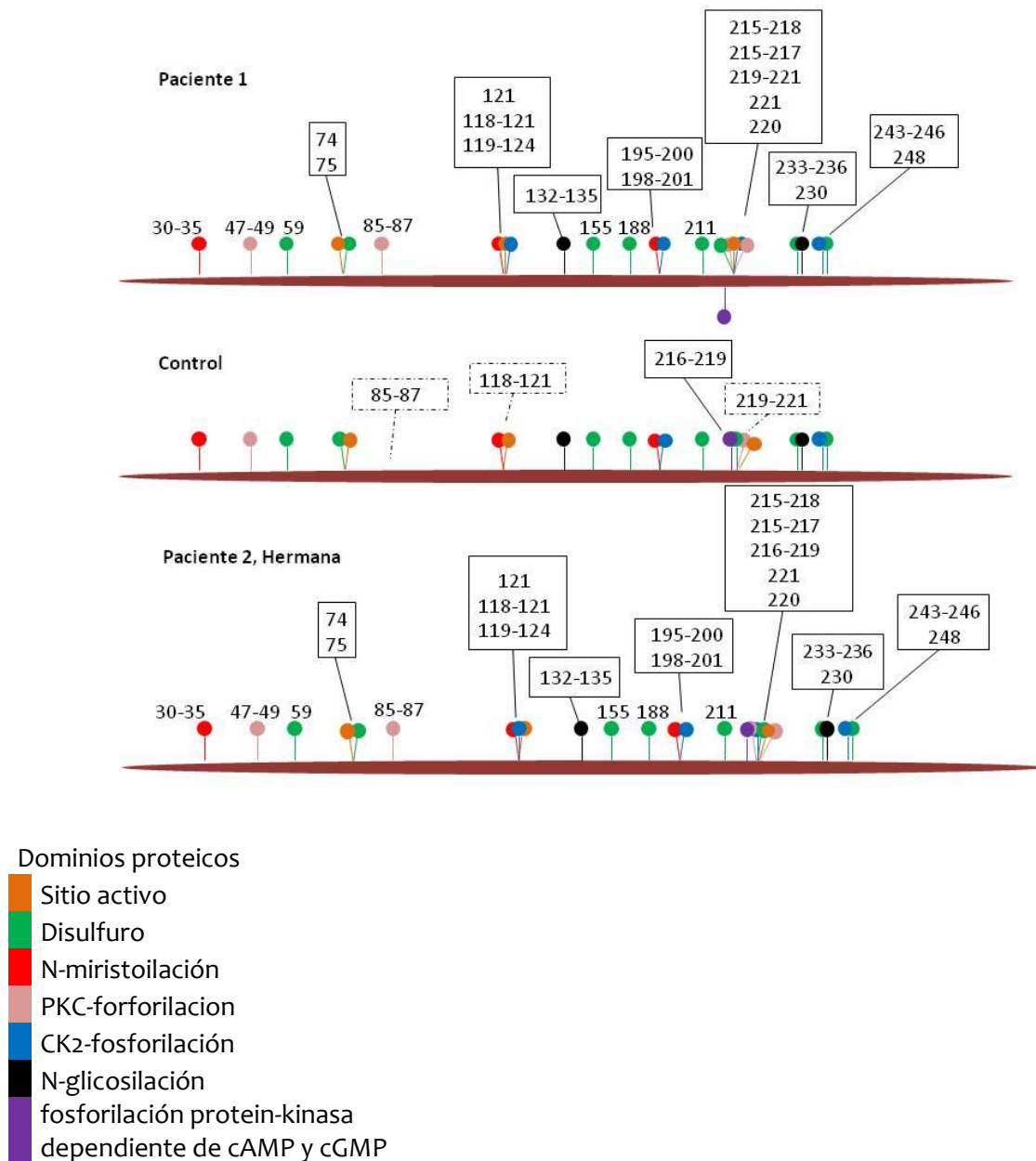
**Tabla 36:** Modificaciones en los aminoácidos y dominios previamente descritas.

	Aminoácidos referencia	Motivo control	Aminoácidos Paciente	Descripción motivo
	GIVGGQ	30-35	GIVGGQ	Miristoilación
	SLR	47-49	SLR	Fosforilación Protein_Kinasa C
	C	59, 75	C	Disulfuro
	H	74	H	Sitio Activo
<b>253G&gt;A</b>	ALR	85-87	<b>TLR</b>	Fosforilación* Protein_Kinasa C
<b>353T&gt;C</b>	IGA	118-121	<b>TGA</b>	Fosforilación* Casein-kinasa II
	GADIAL	119-124	GADIAL	Miristoilación
	D	121	D	Sitio Activo
	NISS	132-135	NISS	N-glicosilación
	C	155, 230	C	Disulfuro
	C	188, 211	C	Disulfuro
	GAYTG	195-200	GAYTG	Miristoilación
	TGDD	198-201	TGDD	Fosforilación Casein-kinasa II
	TRR	215-217	<b>TQR/SRR</b>	Fosforilación Protein_Kinasa C
	TRRD	215-218	<b>TQRD/SRRD</b>	Fosforilación Casein-kinasa II
<b>647G&gt;A</b>	RRDS	216-219	<b>QRDS</b>	Fosforilación** Proteín-Kinasa dependiente de GMPC y AMPc
<b>661C&gt;A</b>	SCQ	219-221	<b>SK</b>	Fosforilación* Protein_Kinasa C
	C	220, 248	C	Disulfuro
	S	224	S	Sitio Activo
	NGTW	233-236	NGTW	N-glicosilación
<b>734G&gt;A</b>	SWGE	243-246	<b>SWDE</b>	Fosforilación Casein-kinasa II

\* Ganancia del sitio en la proteína en paciente 1

\*\* Pérdida del sitio en la proteína en paciente 1

En la figura 50 se reflejan de manera esquemática las diferencias de la paciente 1, previamente descritas.

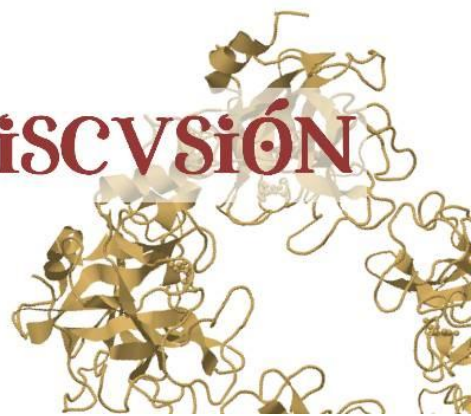


**Figura 50.** Representación esquemática de los dominios proteicos obtenidos en la paciente 1 y la comparación con los individuos control. En la proteína de la paciente, el dominio representado hacia abajo indica pérdida mientras que en el esquema del control las posiciones indicadas en recuadros con líneas discontinuas indican que no se han detectado.

La paciente probando de este estudio presenta unas modificaciones en la secuencia de aminoácidos que no se han descrito previamente, en concreto en las posiciones 115 y 205. La posición 115 forma parte de las cadenas laterales que

delimitan un subsitio hidrofóbico de la proteína y que contribuye a la estabilidad de la proteína. La posición 205 forma parte del bolsillo hidrofóbico S1. Por todo ello, ambas modificaciones podrían tener un claro efecto sobre la función de la proteína. Otro de los aminoácidos diferenciales de la paciente 1 se sitúa en la posición 141. Para esta posición no se ha descrito el efecto en relación con las estructuras secundaria y terciaria.

# DISCUSIÓN





## 6~ DISCUSIÓN

### 6.1.~ SELECCIÓN E INCLUSIÓN DE INDIVIDUOS

La población analizada en este estudio fue seleccionada cumpliendo unos estrictos criterios de inclusión. En el caso del grupo control, los criterios se han basado en la ausencia de positividad en las pruebas cutáneas para aeroalérgenos, ausencia de antecedentes familiares de asma y/o atopia, ausencia de historia clínica de asma y/o atopia y ausencia de enfermedades respiratorias. Con el fin de establecer una relación entre los SNP estudiados y los niveles de triptasa en suero se ha establecido un criterio añadido en la selección de los individuos control, que consistió en la presencia de niveles de triptasa inferiores a 11,4 µg/L. En el grupo de pacientes se han incluido sujetos atópicos con asma. La selección de estos pacientes con asma atópica se ha basado en una descripción previa de asociación entre la distribución genotípica del gen *TPSAB1* y la atopia (13).

La definición de unos criterios claros de inclusión (167), así como la correcta caracterización fenotípica de los individuos resulta esencial en los estudios de asociación. Es bien sabido que la carencia de rigor en la selección fenotípica es uno de los principales motivos de ausencia de replicación en dichos estudios.

Otro de los aspectos fundamentales en los estudios de genotipado es el control de calidad (168) en el laboratorio. El seguimiento de las guías de buenas prácticas resulta fundamental para la fiabilidad de los resultados. En este sentido, en el laboratorio se han seguido las recomendaciones europeas para estudios de genotipado (169).



En este estudio se ha incluido, además, una paciente que presentaba niveles elevados de triptasa y síntomas inespecíficos, en la que se descartó la existencia de mastocitosis mediante estudio de biopsia de médula ósea. También se descartaron posibles etiologías alérgicas y otras enfermedades. El hecho de que los niveles de triptasa no se modificasen durante los episodios agudos y la ausencia de respuesta a un tratamiento con antihistamínicos orales, cromonas e incluso esteroides no permite un diagnóstico de síndrome de activación mastocitaria según los criterios descritos (144), ya que cumple sólo dos de los cuatro criterios (tabla 6) considerados necesarios para incluir dicha patología en este síndrome. Pensando en una elevación de los niveles de triptasa de origen familiar, se analizaron dos hijas y una hermana suya, así como al marido. Tanto las dos hijas como la hermana presentaban niveles elevados de triptasa sin patología asociada.

En la planificación del estudio nos propusimos realizar primero el estudio de asociación y evaluar las frecuencias genotípicas y alélicas en controles para después centrarnos en el análisis de los casos.

## **6.2.~ DISEÑO DEL ESTVDIO**

En este estudio se ha realizado un exhaustivo análisis molecular del gen *TPSAB1*, para lo que se consideraron necesarios distintos abordajes. Uno de ellos consistió en el análisis del gen mediante el estudio de las regiones polimórficas para posteriormente estimar la repercusión que dichas variaciones tienen en la función proteica.

Otro de los abordajes para el análisis del gen consistió en estudiar la región promotora para describir y caracterizar las posibles modificaciones en la expresión génica, debidas tanto a mecanismos epigenéticos como de control transcripcional clásico. Para dilucidar estos puntos se realizaron aproximaciones teóricas mediante análisis *in silico*, para determinar el alcance e importancia de las mismas.

Un abordaje adicional consistió en el análisis de la expresión del gen con el fin de establecer las diferencias con respecto a la muestra de individuos control.

En último término se procedió a caracterizar de manera teórica y por medio de algoritmos implementados en software online, la proteína resultante de la traducción del ADNc. Una vez obtenida la proteína predicha se procedió al análisis de sus dominios y al análisis de estos con respecto a los propios de la proteína silvestre.

### **6.3.~ ANÁLISIS DEL GEN *TPSAB1* EN CONTROLES Y PACIENTES.**

En este trabajo se han encontrado 20 nuevos polimorfismos en la región génica, no estudiados con anterioridad: 12 de ellos identificados tras los alineamientos, pero cuyas frecuencias no fueron representativas no pudieron analizarse, y ocho en los que se pudo analizar la distribución alélica y genotípica. En relación con las frecuencias de estos nuevos SNP obtenidas en nuestra muestra de estudio destacan el caso de IVS5+23C>A, cuyo alelo mutado únicamente ha sido detectado en homocigosis, por lo que se podría inferir que la discrepancia sea debida al origen de la secuencia consenso anotada.

Los estudios previos realizados por Guida y cols (166) han proporcionado una base para el estudio de los polimorfismos en el gen *TPSAB1*. Los SNP propuestos por ellos fueron estudiados en tres poblaciones: de raza blanca, negra y una población mixta. En nuestro trabajo se analizan por primera vez las frecuencias alélicas y genotípicas en una población europea.

Según Guida (166), en su trabajo se analizaron dos genes *TPS1* y *TPS2* que codificaban  $\beta$ -triptasa y  $\alpha$ -triptasa respectivamente, siguiendo la nomenclatura actual habría estudiado *TPSB2* y *TPSAB1*. Como se ha comentado, los oligonucleótidos que proponen no permitieron diferenciar ambos genes, como era su intención, por lo que los resultados se han considerado bajo este prisma. En este sentido, Soto (13), dos años más tarde, afirmó que según el trabajo planteado por Guida no se podían identificar polimorfismos asociados con la forma  $\beta$ III, y, según nuestro análisis de las bases de datos y secuencias anotadas, mediante los oligonucleótidos proporcionados en los estudios publicados no es posible determinar, sólo por secuenciación, las distintas formas de los genes de triptasa en una muestra de individuos.

En el estudio comparativo se ha observado que la distribución genotípica de algunos SNP encontrada en nuestra población es distinta de la descrita para la población americana de raza caucásica (156). Además, algunos de los SNP no han podido ser confirmados en nuestra muestra, como es el caso de *IVS1-8C>T*, *52C>T*, *68G>T* y *153C>T*. La mayor discrepancia se ha observado con el polimorfismo *153C>T*, que no ha sido detectado en nuestra muestra de estudio. En otros casos, los alelos

mutados de ciertos polimorfismos se han detectado con frecuencias superiores a las descritas. En todos estos casos se cumplió el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Las diferencias descritas pueden ser debidas al distinto origen étnico de la población estudiada. La población de raza blanca analizada en los estudios americanos no suele ser una población pura, pudiendo existir una estratificación étnica en mayor o menor medida. Hecho que en nuestra muestra de estudio apenas se observa (170).

### 6.3.1.~ ESTVDIO DE HAPLOTIPOS

El estudio de haplotipos resulta esencial en los estudios de asociación, ya que la información que aporta el estudio de SNP de modo independiente es muy limitada (171) al proporcionar información sobre modificaciones puntuales sin tener en cuenta la coexistencia con otros SNP. En ocasiones, los resultados de los estudios de asociación se han visto modificados cuando se analizaron otros SNP de forma simultánea. Al final, nuestro análisis proporciona información útil de la secuencia específica de cada uno de los alelos. La limitación de los estudios en los genes de triptasa está relacionada con la elevada homología existente entre los genes *TPSAB1* y *TPSB2* (14). Las variantes iniciales obtenidas proporcionan información simultánea sobre la misma región, probablemente de diferentes genes, de modo que se podría explicar el hecho de que aparentemente determinados SNP sean detectados únicamente en heterocigosis. Por esta razón, decidimos clonar los productos de PCR, con el fin de confirmar la secuencia alélica real. Mediante esta estrategia confirmamos 7 combinaciones teóricas proporcionadas por el software

*SNPanalyzer*. Además, mediante el análisis de clonación se detectó una combinación nueva, lo que pone de manifiesto cierta limitación de los algoritmos teóricos.

### 6.3.2. ~ ANÁLISIS DE RFLP

El estudio del RFLP no permitió identificar ninguna asociación significativa entre las características clínico-biológicas analizadas y la presencia de la forma  $\alpha$  determinada por RFLP, si bien se observó una mayor presencia de ésta en los controles frente a los pacientes con asma alérgica, aunque este resultado no alcanzó significación estadística. Previamente, Soto y cols (13) habían sugerido un posible carácter protector de la forma  $\alpha$  respecto a las enfermedades alérgicas, que relacionaron con la incapacidad de esta forma para permanecer almacenada, con lo que no sería liberada en gran cantidad tras la exposición al antígeno (20).

Del mismo modo, la presencia de unos niveles más elevados de triptasa en el suero de los pacientes que portan la forma  $\alpha$  podría estar relacionada con una secreción constante de dicha proteína. En nuestra población hemos encontrado un aumento de los niveles de triptasa en el suero de los pacientes portadores de esta forma  $\alpha$ . Es importante tener en cuenta que los niveles de triptasa determinados en suero están condicionados por los epitopos proteicos reconocidos por el sistema InmunoCap.

Respecto al análisis genotípico del gen *TPSAB1*, cabe destacar que, metodológicamente, sólo se puede inferir la presencia de la forma  $\alpha$ , pero no discriminar entre homocigosis y heterocigosis. En este sentido, si se relacionan las frecuencias obtenidas en estudios previos (13) con las obtenidas en este trabajo

podría establecerse que la frecuencia obtenida para la forma  $\alpha$  constituiría el total de las frecuencias genotípicas de  $\alpha\beta$  y  $\alpha\alpha$ .

Teniendo en cuenta únicamente la presencia de la forma  $\alpha$  en la población de raza blanca estudiada por Soto (13), en nuestro estudio se obtuvo una frecuencia muy similar a la descrita.

#### **6.4.~ ANÁLISIS DEL GEN *TPSAB1* EN PACIENTES CON TRIPTASA ELEVADA.**

En nuestro estudio nos encontramos ante una peculiaridad clínica muy interesante, la detección de niveles elevados de triptasa en varios miembros de una misma familia, en concreto la madre, dos hijas y la hermana de la madre. Además, las tres últimas no presentaban ningún tipo de sintomatología. Y respecto a la primera, se descartó una mastocitosis mediante biopsia de médula ósea. Por otro lado, sus manifestaciones clínicas tampoco parecen corresponder con un síndrome de activación mastocitaria, puesto que los niveles de triptasa no se elevaban durante los episodios agudos y no hubo respuesta al tratamiento específico (144, 172). Esta situación no ha sido descrita previamente en la bibliografía y consideramos que es uno de los aspectos más relevantes de este estudio. Por eso decidimos realizar un análisis exhaustivo de las regiones polimórficas, tanto en la región promotora como codificante, con el objeto de inferir posibles asociaciones entre las variantes génicas de esta familia así como de la hermana de la paciente, con niveles elevados de triptasa y que no presentó ninguna clínica. De este modo, podría establecerse una relación entre dichas variantes y el fenotipo de hipertriptasemia familiar (término con el que sugerimos definir la presencia de niveles elevados de triptasa en suero en miembros de una familia sin encontrarse

para ello explicación clínica). El uso de este término se basa en la homología con la denominada *hiperamilasemia familiar* (173).

#### **6.4.1.~ ANÁLISIS DEL PROMOTOR**

En la paciente probando de nuestro estudio se ha identificado un patrón de unión de factores de transcripción específicos en la región promotora del gen claramente diferenciado del de los controles. La comprensión de la regulación de la expresión génica es parte importante en el análisis de los genes objetos de estudio. La unión de un factor de transcripción a una región concreta del promotor de un gen puede aumentar o reducir la expresión de dicho gen. Cada factor reconoce una familia de secuencias similares, generalmente de en torno a 4-10 bases de longitud con distintos grados de conservación en cada posición.

La identificación de las regiones reguladoras potenciales en una nueva secuencia es cada vez más importante para los diseños experimentales (162); de hecho, el detectar los factores de transcripción con capacidad potencial para unirse es uno de los pasos fundamentales en el análisis de esta región del gen (163).

En nuestra paciente se ha identificado un patrón diferencial que incluye la aparición de nuevos factores de unión, *SIX4* y *TP53*, y la desaparición de los sitios *E-box binding factors*, *HIF/bHLH/PAS protein family*, *EGR/NGF induced protein C*, *MAZ*, *PAX-4/PAX-6*, *Activator protein 2*, *MyoD (myf3)*, *ATOH1*, *HATH1*, *MATH-1*, *HOX-PBX complexes* y *Meis1a*, así como el aumento de la disponibilidad de sitios de unión de factores de transcripción ya descritos como *MITF* (113).

Las triptasas de ratón (*mMCP-6* y *mMCP-7*) han servido como modelo, mediante estudios *in vitro* e *in vivo* de la proteína, para el estudio de la triptasa humana (113, 174). Fue en los genes que codifican estas proteasas donde primero se estudiaron los factores que regulan dicha transcripción, como son los factores *mi* (MITF), PEB2 (114) o MAZ (175). Merece la pena destacar que la formación de un complejo constituido por estas tres proteínas permite una transcripción más eficiente de *mMCP-6* en mastocitos múridos (115).

En la bibliografía han sido ampliamente estudiados los factores de transcripción MITF, activina A y TGF- $\beta$ . Por ejemplo, TGF- $\beta$ , en sinergia con activina, inhibe el crecimiento de los progenitores de mastocitos, mientras que induce la diferenciación hacia mastocitos maduros (119). De estos factores se ha sugerido que MITF regula negativamente la transcripción de *mMCP-7* por medio de la inhibición de Smad3, mientras que la transcripción del gen de otra proteasa de ratón (*mMCP-6*) inducida por la vía TGF- $\beta$  es regulada de manera diferencial por varias isoformas de MITF (176). Es éste último factor de transcripción el más estudiado en proteasas de ratón; así, se han descrito tres secuencias consenso en el gen *mMCP-6* pero ninguna en *mMCP-7* (117). En determinados estudios se ha concretado que los elementos dependientes de MITF deben estar conservados entre las posiciones -817 a -715 y -421 a -202 de la región promotora del gen de triptasa- $\beta$ 1 (177).

En 2001, Morii y cols describieron tres regiones del promotor indispensables para la unión del factor MITF (113); la mutación en estas secuencias reduce la magnitud de la transactivación de este factor de transcripción. Entre estas secuencias GACCTG parece desempeñar un papel más importante.



Otra de las regiones que se han descrito como fundamental para la activación transcripcional del gen *mMCP-6* por MITF se localizó entre los nucleótidos -166 a -161, en la proximidad de la secuencia CAGA, de importancia para la activación por medio de la señal de TGF- $\beta$  (nucleótidos -153 a -150) (176); esta secuencia es la ya mencionada, GACCTG (113-115). Otro de los factores descritos ha sido PEBP2, que reconoce la secuencia TGTGGTC, que se solapa parcialmente con la de unión de MITF, por lo que ambos factores actúan de manera sinérgica. En último término, se ha descrito la asociación de MITF con otros factores de transcripción, como PEBP2 y *Myc-associated zinc-finger proteína related factor (MAZR)* (114, 178).

Pese a los numerosos estudios llevados a cabo en mastocitos de ratón, los mecanismos transcripcionales en el gen de la triptasa en mastocitos humanos permanecen sin estar desvelados por completo. En 2010 se llevaron a cabo estudios en mastocitos humanos y, de manera análoga a lo que se demostró en *mMCP-6*, se describió que MITF desempeña un papel esencial en la regulación en la expresión de dicho gen (179) y, de manera concreta, la isoforma MITF-A (177). En nuestra paciente se observa una mayor disponibilidad de la región de unión de este factor de transcripción, lo que podría estar modificando el nivel de expresión de triptasa.

Uno de los factores de transcripción encontrados diferentes entre las pacientes 1 y 4, con niveles elevados de triptasa, es AP2 (*Activator protein 2*). Este factor de transcripción se ha descrito por su implicación en modelos de diferenciación de mastocitos así como en mastocitos de mastocitoma inmaduro (180). En nuestro caso, dicho factor de transcripción no puede unirse a la posición -567 del promotor de la primera paciente.

En cuanto a los factores de transcripción encontrados diferentes en la paciente, ya sea por la capacidad de unión a la secuencia del promotor o por carecer de ella, no se ha encontrado más información debido a que aún los estudios en humanos son incipientes.

Otra característica del patrón de unión de los factores de transcripción de la paciente es su diferencia con los otros miembros de la familia: de hecho, estos otros individuos presentaban niveles elevados pero no tan extremos como la paciente y lo que es más importante, sin ninguna manifestación clínica. De hecho, su patrón de unión (de los otros miembros de la familia) fue muy similar al de los controles, con alguna variación puntual, por lo que parece plausible que las diferencias con la paciente, en cuanto a la unión o no de los factores de transcripción indicados, sean las responsables de los niveles tan elevados de triptasa en ella.

#### 6.4.2.~ REGIÓN CODIFICANTE

La secuenciación previa del gen *TPSAB1* de la familia (madre y dos hijas) se realizó con el fin de identificar los SNP que portaban estos pacientes, para, posteriormente, estudiar en profundidad una región concreta que se consideró altamente polimórfica y más informativa. De todos los SNP estudiados destacan los que presentan el alelo mutado en homocigosis en los pacientes con triptasa elevada como IVS1+89T>C y 96T>C, el último de los cuales es exónico.

En el análisis de la región comprendida entre el exón 5 y el exón 6, que incluye también el intrón 5 se observó que la paciente probando del estudio presentaba el alelo mutado en homocigosis en todos los casos.

Como se ha comentado, el análisis de haplotipos resulta esencial en estudios de asociación. Como era esperable se han detectado haplotipos diferenciales para los miembros de la familia y en especial para la paciente probando. Esta es otra de las peculiaridades de la paciente frente al resto de individuos analizados y que la secuencia primaria de la forma proteica expresada específicamente por la paciente. De hecho, el haplotipo incluye los SNP 647G>A y 661C>A, que modifican los dominios y 613G>A que modifica el residuo de la posición 205 y 644C>G que codifica un aminoácido diferencial entre  $\alpha$  y  $\beta$ .

## 6.5.~ ANÁLISIS DE EXPRESIÓN

### 6.5.1.~ ANÁLISIS CVANTITATIVO

El estudio nos permitió comprobar la expresión de manera absoluta del ARNm de la triptasa y se obtuvo una notable diferencia en los pacientes con niveles elevados de triptasa, en especial en la paciente probando, que presenta un nivel de expresión de ARNm 34 veces superior al de los controles. Esta paciente presentaba niveles de triptasa mantenidos con una media de 48,15  $\mu\text{g/L}$ . La hermana de esta paciente presentaba niveles de triptasa también elevados, pero algo inferiores, así como una expresión de ARNm también algo inferior. Desafortunadamente, no dispusimos de ARN procedente de las hijas para este análisis, si bien cabe esperar que los niveles de expresión no fueran tan elevados como los de la madre, ya que las cifras de triptasa sérica de estas eran también inferiores (aproximadamente 25  $\text{mg/L}$ ).

### 6.5.2.~ ANÁLISIS DE EXPRESIÓN CUALITATIVO

El análisis del ADN complementario resultante de la retrotranscripción del ARN de cada uno de los individuos incluidos en esta parte del estudio permitió establecer las diferencias existentes y realizar una aproximación de la proteína resultante tras la traducción de la secuencia codificante obtenida. Este estudio permitió confirmar las diferencias obtenidas en secuenciación genómica, si bien se detectaron algunas diferencias puntuales que pudieran ser debidas al proceso exponencial de amplificación de la PCR o a otros fenómenos descritos asociados a modificaciones transcripcionales (181-187).

En relación con el control transcripcional, hasta la fecha sólo se comunicado un estudio sobre ajuste (*splicing*) alternativo en el gen de triptasa, llevado a cabo por Jackson y cols en 2008 (105); en este estudio se reseña que las variantes presentan un sitio aceptor alternativo en el exón 4 que da lugar a la delección de 27 nucleótidos en la parte central de la secuencia codificante. En nuestro estudio no ha podido ser identificada tal modificación en ninguno de los pacientes y controles analizados.

Otro mecanismo de control de la transcripción se basa en las modificaciones epigenéticas, que se han definido como cambios en la secuencia genómica no heredables que modifican la expresión génica. La metilación se considerada la modificación covalente más frecuente del ADN (188). Esta metilación tiene lugar en regiones denominadas islas CpG. En los genes de triptasa no se han descrito islas CpG para los genes *TPSAB1*, *TPSB2* y *TPSG1* pero sí para el gen *TPSD1*, según los datos disponibles en la base *Genome Browser*. Se ha descrito una isla CpG de una longitud

en el genoma de 304 pares de bases con un porcentaje de CpG del 17,1 % (*Genome Browser*). En nuestro estudio no se han identificado islas CpG por lo que descartamos este factor en el mecanismo del control transcripcional de la expresión de triptasa en esta paciente.

## 6.6.~ ANÁLISIS PROTEICO

Una vez obtenida la secuencia de ADNc y con el fin de traducir la proteína resultante se realizó la predicción haplotípica mediante el software *SNPalyzer*.

En nuestro estudio se han encontrado diferencias entre las proteínas predichas de la paciente probando con triptasa elevada y los individuos control. Varias de las diferencias identificadas ya habían sido previamente descritas y parecen ser debidas a las distintas formas de triptasa  $\alpha$  y  $\beta$  descritas (189), sin embargo merece la pena destacar tres nuevas modificaciones que no han sido descritas previamente. Una de las modificaciones, localizada en el residuo 115, forma parte de las cadenas laterales de la proteína que delimitan un subsitio hidrofóbico, que contribuye a la estabilidad de la triptasa. Otra modificación, en la posición 205, forma parte del bolsillo hidrofóbico, que podría estar implicado en los mecanismos de acción frente al sustrato. Por todo ello ambas modificaciones podrían tener un claro efecto sobre la función de la proteína, mientras que la tercera modificación, en el residuo 141, no parece tener un efecto conocido sobre la estructura secundaria de la proteína.

Merece la pena destacar que la hermana de la paciente, que también presentaba niveles elevados de triptasa, aunque no tanto como la paciente

probando, y se encontraba asintomática, presentaba un patrón de expresión proteica muy similar al de los controles por lo que, las diferencias que presenta con su hermana se relacionan con este patrón de expresión y con la presencia de sintomatología clínica. Aunque la paciente probando no cumpla los criterios de un SAM (172), no se puede descartar que la clínica de la paciente pudiera, hipotéticamente, estar relacionada con estas modificaciones que repercuten en la actividad y estabilidad de la proteína.

Se sabe que el receptor sobre el que actúa la triptasa es PAR-2 y sobre este receptor se han llevado a cabo distintos estudios en diferentes localizaciones celulares. De hecho, se ha descrito una función dicotómica según el tejido, ya que, por una parte, la activación de PAR-2 puede tener un efecto de broncoprotección en las vías respiratorias, efecto mediado por la activación de PAR-2 epiteliales y que se ha relacionado con la relajación de vasos sanguíneos (190). Por otra parte, la activación de PAR-2 puede producir contracción de vías respiratorias (191). También se sabe que la triptasa posee un sitio de fosforilación de la proteína-quinasa C. La activación de esta proteína provoca la inactivación de PAR-2 en células endoteliales (192). En nuestro estudio identificamos algunas diferencias previamente descritas, que atribuimos a las distintas formas de triptasa que proporcionarían a la paciente dos sitios de fosforilación extra que podrían estar implicados en la activación de la proteína-quinasa que, en último término, inactivaría el receptor PAR-2 (193).

Se ha descrito que PAR-2 se expresa en tejido nervioso sensorial y es responsable de la inflamación neurogénica (194). La interacción de P2X<sub>3</sub> con el receptor PAR-2 puede contribuir al dolor inflamatorio, y la utilización de inhibidores

de PKC y PKA suprime esta potenciación; de hecho, la activación de estas dos proteasas imitan la potenciación mediada por PAR-2 (194). El dominio de fosforilación de proteína-cinasa dependiente de AMPc y GMPc está ausente en la proteína de la paciente indicada (paciente probando) y es destacable que se ha descrito la activación de la proteína-cinasa G en la pared de los vasos sanguíneos, entre cuyas funciones incluiría vasodilatación, permeabilidad vascular, inhibición de la agregación plaquetaria e inhibición de la proliferación de las células de músculo liso (195-198). Actualmente, permanecen sin ser completamente dilucidados los mecanismos por los que la supresión de PKG en condiciones de respuesta inflamatoria puede tener efecto sobre el daño vascular (199).

## **6.7.~ LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

La principal dificultad en la realización de este estudio se debe a la elevada homología entre las secuencias de los genes que codifican la triptasa, lo que ha dificultado la identificación de las distintas formas de triptasa en los pacientes. Para minimizar este efecto hemos recurrido al análisis pormenorizado de las escasas zonas diferenciales. Además, para confirmar la disposición alélica de las variantes génicas identificadas hemos planteado la clonación de los fragmentos amplificados como estrategia de abordaje que proporciona la disposición exacta de los nucleótidos en cada uno de los alelos.

Por otro lado, al ser una secuencia génica muy polimorfa da lugar a un elevado número de combinaciones de variantes génicas. A medida que aumenta el número de variantes incluidas en un haplotipo disminuye el número de casos portadores de ese haplotipo, lo que dificulta el estudio de asociación.

Otra dificultad surgió al intentar comparar las frecuencias alélicas con las de otras poblaciones ya que se emplearon oligonucleótidos descritos por otros autores, que en ocasiones generaban fragmentos muy pequeños, por lo que hemos tenido que solapar regiones en el genoma.

En resumen, nos encontramos ante una paciente con niveles muy elevados de triptasa y con clínica no compatible con ningún proceso descrito hasta el momento. Se observa un carácter familiar en relación con los niveles elevados de triptasa. El estudio génico ha permitido identificar modificaciones en la región promotora que podrían ser las responsables del aumento cuantitativo constante de la triptasa; sin embargo, esta paciente presentaba crisis de sintomatología clínica durante las que no se aprecia un aumento significativo de niveles de triptasa ni respuesta a antihistamínicos ni esteroides, pero que podrían estar relacionadas con alguna de las formas expresadas por la paciente en condiciones de desgranulación de los mastocitos; no se puede descartar que las modificaciones en la estructura primaria de la proteína pudieran estar relacionadas con la sintomatología de esta paciente. Dada la elevada homología entre las distintas formas de triptasa, sería de gran utilidad un abordaje proteómico para poder secuenciar la proteína de la paciente, especialmente en los momentos de crisis, y, por supuesto, acompañarlo de estudios de carácter funcional. En definitiva, nos encontramos ante el primer caso descrito de elevación de triptasa de carácter familiar y en el que, además, identificamos modificaciones génicas específicas no descritas previamente que podrían estar relacionadas con el fenotipo de la paciente.





# CONCLVSiONES





## 7~ CONCLUSIONES

- 1- El gen *TPSAB1* se caracteriza por ser un gen polimórfico. En este estudio describimos por primera vez en su secuencia génica 20 nuevos polimorfismos de un único nucleótido no estudiados previamente.
- 2- En este trabajo se identifica mediante clonación una nueva combinación haplotípica basada en los SNP estudiados, no predicha por los algoritmos teóricos. Debido a las limitaciones de los estudios en los genes de triptasa, relacionadas con la elevada homología existente entre los genes *TPSAB1* y *TPSB2* proponemos la clonación como método de confirmación para identificar las secuencias alélicas reales.
- 3- No se ha encontrado asociación estadísticamente significativa entre los parámetros clínico-biológicos y la forma  $\alpha$  triptasa, si bien se han detectado niveles de triptasa discretamente inferiores en individuos portadores de la forma  $\alpha$ , lo que podría relacionarse con la secreción constitutiva de la misma.
- 4- Los niveles elevados de expresión de ARNm del gen de la triptasa podrían estar relacionados con el fenotipo de los pacientes con niveles elevados de triptasa sérica. De hecho, los niveles extremos de expresión de ARNm en la paciente probando del estudio se correlacionaron con los niveles de triptasa sérica más elevados.
- 5- Se ha detectado un patrón de unión de factores de transcripción específico en la región promotora del probando claramente diferenciado del de los

controles y que podría estar relacionado con la expresión de ARNm de la paciente con niveles elevados de triptasa. Entre los factores de transcripción detectados destacan MITF y MAZ que se han descrito implicados en el control de la expresión de triptasa en modelos murinos.

- 6- Se han detectado varios polimorfismos en la secuencia del gen de la triptasa que modifican el aminoácido codificado en posiciones con implicaciones tanto en la estabilidad como en los motivos de fosforilación. Estas modificaciones podrían estar relacionadas con el fenotipo de la paciente con niveles elevados de triptasa.
- 7- Describimos por primera vez la existencia de una entidad nosológica que denominamos hipertriptasemia familiar en la que distintos miembros de una misma familia presentan niveles elevados de triptasa.

## CONCLUSIONS

- 1- *TPSAB1* gene is a polymorphic gene. In this study, we described for the first time 20 not previously studied Single Nucleotide Polymorphisms.
- 2- We detected by cloning techniques a new haplotype SNP combination not predicted by theoretical algorithms. Due to the limitations of tryptase gene studies, related to the high homology existing between *TPSAB1* and *TPSB2* genes, we propose the cloning as a method to confirm the real allelic sequence.
- 3- No statistically significant association was found between the clinical-biological parameters and  $\alpha$ -tryptase form, although slightly lower tryptase levels were obtained in individuals carrying the  $\alpha$  form, which could be related to the constitutive secretion.
- 4- High mRNA expression levels of tryptase gene may be related to the phenotype of patients with elevated levels of serum tryptase. In fact, the highest levels of tryptase mRNA in the proband correlated to the highest serum tryptase levels.
- 5- A specific binding pattern of transcription factors in the promoter region of the proband was clearly different from controls. This could be related to the mRNA expression of the propositus. Among the described transcription factors we highlight MITF and MAZ previously reported as involved in tryptase expression in mouse models.

- 6- Several SNPs were detected in the *TPSAB1* gene of the propositus that modifies the coded aminoacids located in specific positions involved both in stability and phosphorylation activity. These modifications could be related to the phenotype of the patient with high levels of tryptase.
  
- 7- We describe for the first time a nosological entity that we call *familial hypertryptasemia* in which different members of the same family present elevated levels of serum tryptase.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS







## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Glenner GG, Cohen LA. Histochemical demonstration of a species-specific trypsin-like enzyme in mast cells. *Nature*, 1960; 185: 846-7.
2. Schwartz LB, Lewis RA, Austen KF. Tryptase from human pulmonary mast cells. Purification and characterization. *J Biol Chem* 1981; 256(22): 11939-43.
3. Chiu H, Lagunoff D. Histochemical comparison of vertebrate mast cells. *Histochem J* 1972; 4(2): 135-44.
4. Schwartz LB, Lewis RA, Seldin D, Austen KF. Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells. *J Immunol* 1981; 126(4): 1290-4.
5. Miller JS, Moxley G, Schwartz LB. Cloning and characterization of a second complementary DNA for human tryptase. *J Clin Invest* 1990; 86(3): 864-70.
6. Miller JS, Westin EH, Schwartz LB. Cloning and characterization of complementary DNA for human tryptase. *J Clin Invest* 1989; 84(4): 1188-95.
7. Vanderslice P, Ballinger SM, Tam EK, Goldstein SM, Craik CS, Caughey GH. Human mast cell tryptase: multiple cDNAs and genes reveal a multigene serine protease family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(10): 3811-5.
8. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005; 6(2): 135-42.
9. Blair RJ, Meng H, Marchese MJ, Ren S, Schwartz LB, Tonnesen MG, et al. Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. *J Clin Invest* 1997; 99(11): 2691-700.
10. Nico B, Marzullo A, Corsi P, Vacca A, Roncali L, Ribatti D. A possible role of tryptase in angiogenesis in the brain of mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy. *Neuroscience* 2004; 123(3): 585-8.
11. Somasundaram P, Ren G, Nagar H, Kraemer D, Mendoza L, Michael LH, et al. Mast cell tryptase may modulate endothelial cell phenotype in healing myocardial infarcts. *J Pathol* 2005; 205(1): 102-11.

12. Hallgren J, Pejler G. Biology of mast cell tryptase. An inflammatory mediator. *FEBS J* 2006; 273(9): 1871-95.
13. Soto D, Malmsten C, Blount JL, Muilenburg DJ, Caughey GH. Genetic deficiency of human mast cell alpha-tryptase. *Clin Exp Allergy* 2002; 32(7): 1000-6.
14. Pallaoro M, Fejzo MS, Shayesteh L, Blount JL, Caughey GH. Characterization of genes encoding known and novel human mast cell tryptases on chromosome 16p13.3. *J Biol Chem* 1999; 274(6): 3355-62.
15. Smith TJ, Hougland MW, Johnson DA. Human lung tryptase. Purification and characterization. *J Biol Chem* 1984; 259(17): 11046-51.
16. Wong GW, Yasuda S, Madhusudhan MS, Li L, Yang Y, Krilis SA, et al. Human tryptase epsilon (PRSS22), a new member of the chromosome 16p13.3 family of human serine proteases expressed in airway epithelial cells. *J Biol Chem* 2001 276 (52): 49169-82.
17. Fiorucci L, Ascoli F. Mast cell tryptase, a still enigmatic enzyme. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(11): 1278-95.
18. Marquardt U, Zettl F, Huber R, Bode W, Sommerhoff C. The crystal structure of human alpha1-tryptase reveals a blocked substrate-binding region. *J Mol Biol* 2002; 321(3): 491-502.
19. Huang C, Li L, Krilis SA, Chanasyk K, Tang Y, Li Z, et al. Human tryptases alpha and beta/II are functionally distinct due, in part, to a single amino acid difference in one of the surface loops that forms the substrate-binding cleft. *J Biol Chem* 1999; 274(28): 19670-6.
20. Hogan AD, Schwartz LB. Markers of mast cell degranulation. *Methods* 1997; 13(1):43-52.
21. Sakai K, Ren S, Schwartz LB. A novel heparin-dependent processing pathway for human tryptase. Autocatalysis followed by activation with dipeptidyl peptidase I. *J Clin Invest* 1996; 97(4): 988-95.
22. Wolters PJ, Pham CT, Muilenburg DJ, Ley TJ, Caughey GH. Dipeptidyl peptidase I is essential for activation of mast cell chymases, but not tryptases, in mice. *J Biol Chem* 2001; 276(21): 18551-6.

23. McNeil HP, Adachi R, Stevens RL. Mast cell-restricted tryptases: structure and function in inflammation and pathogen defense. *J Biol Chem* 2007; 282(29): 20785-9.
24. Fajardo I, Pejler G. Formation of active monomers from tetrameric human beta-tryptase. *Biochem J* 2003; 369(Pt 3): 603-10.
25. Xia HZ, Kepley CL, Sakai K, Chelliah J, Irani AM, Schwartz LB. Quantitation of tryptase, chymase, Fc epsilon RI alpha, and Fc epsilon RI gamma mRNAs in human mast cells and basophils by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Immunol* 1995; 154(10): 5472-80.
26. Caughey GH. Tryptase genetics and anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(6): 1411-4.
27. Caughey GH, Raymond WW, Blount JL, Hau LW, Pallaoro M, Wolters PJ, et al. Characterization of human gamma-tryptases, novel members of the chromosome 16p mast cell tryptase and prostatic gene families. *J Immunol* 2000; 164(12): 6566-75.
28. Wang HW, McNeil HP, Husain A, Liu K, Tedla N, Thomas PS, et al. Delta tryptase is expressed in multiple human tissues, and a recombinant form has proteolytic activity. *J Immunol* 2002; 169(9): 5145-52.
29. Reynolds DS, Stevens RL, Lane WS, Carr MH, Austen KF, Serafin WE. Different mouse mast cell populations express various combinations of at least six distinct mast cell serine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(8): 3230-4.
30. McNeil HP, Reynolds DS, Schiller V, Ghildyal N, Gurley DS, Austen KF, et al. Isolation, characterization, and transcription of the gene encoding mouse mast cell protease 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(23): 11174-8.
31. Wong GW, Yasuda S, Morokawa N, Li L, Stevens RL. Mouse chromosome 17A3.3 contains 13 genes that encode functional tryptic-like serine proteases with distinct tissue and cell expression patterns. *J Biol Chem* 2004; 279(4): 2438-52.
32. Selwood T, Wang ZM, McCaslin DR, Schechter NM. Diverse stability and catalytic properties of human tryptase alpha and beta isoforms are mediated by residue differences at the S1 pocket. *Biochemistry* 2002; 41(10): 3329-40.

33. Sommerhoff CP, Bode W, Matschiner G, Bergner A, Fritz H. The human mast cell tryptase tetramer: a fascinating riddle solved by structure. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477(1-2): 75-89.
34. Lindstedt KA, Kokkonen JO, Kovanen PT. Regulation of the activity of secreted human lung mast cell tryptase by mast cell proteoglycans. *Biochim Biophys Acta* 1998;1425(3): 617-27.
35. Schwartz LB, Bradford TR. Regulation of tryptase from human lung mast cells by heparin. Stabilization of the active tetramer. *J Biol Chem* 1986; 261(16): 7372-9.
36. Hallgren J, Spillmann D, Pejler G. Structural requirements and mechanism for heparin-induced activation of a recombinant mouse mast cell tryptase, mouse mast cell protease-6: formation of active tryptase monomers in the presence of low molecular weight heparin. *J Biol Chem* 2001; 276(46): 42774-81.
37. Selwood T, Smolensky H, McCaslin DR, Schechter NM. The interaction of human tryptase-beta with small molecule inhibitors provides new insights into the unusual functional instability and quaternary structure of the protease. *Biochemistry* 2005; 44(9): 3580-90.
38. Hallgren J, Lindahl S, Pejler G. Structural requirements and mechanism for heparin-dependent activation and tetramerization of human beta1- and beta11-tryptase. *J Mol Biol* 2005; 345(1): 129-39.
39. Alter SC, Kramps JA, Janoff A, Schwartz LB. Interactions of human mast cell tryptase with biological protease inhibitors. *Arch Biochem Biophys* 1990; 276(1): 26-31.
40. Addington AK, Johnson DA. Inactivation of human lung tryptase: evidence for a re-activatable tetrameric intermediate and active monomers. *Biochemistry* 1996; 35(42): 13511-8.
41. Schechter NM, Choi EJ, Selwood T, McCaslin DR. Characterization of three distinct catalytic forms of human tryptase-beta: their interrelationships and relevance. *Biochemistry* 2007; 46(33): 9615-29.
42. Metcalfe DD, Klebanoff SJ, Henderson WR. *Fed Proc* 1984; 43.
43. Fukuoka Y, Schwartz LB. Active monomers of human beta-tryptase have expanded substrate specificities. *Int Immunopharmacol* 2007; 7(14): 1900-8.

44. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev* 1997; 77(4): 1033-79.
45. Castells MC, Irani AM, Schwartz LB. Evaluation of human peripheral blood leukocytes for mast cell tryptase. *J Immunol* 1987; 138(7): 2184-9.
46. Craig SS, Schechter NM, Schwartz LB. Ultrastructural analysis of human T and TC mast cells identified by immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 1988; 58(6): 682-91.
47. Harvima IT, Schechter NM, Harvima RJ, Fraki JE. Human skin tryptase: purification, partial characterization and comparison with human lung tryptase. *Biochim Biophys Acta* 1988; 957(1): 71-80.
48. Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(12): 4464-8.
49. Marone G, Casolaro V, Patella V, Florio G, Triggiani M. Molecular and cellular biology of mast cells and basophils. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 114(3): 207-17.
50. Schechter NB, A. On the size of the active site in proteases. *Biochem Biophys Res Commun* 1967; 27: 157-62.
51. Harris JL, Niles A, Burdick K, Maffitt M, Backes BJ, Ellman JA, et al. Definition of the extended substrate specificity determinants for beta-tryptases I and II. *J Biol Chem* 2001; 276(37): 34941-7.
52. Pereira PJ, Bergner A, Macedo-Ribeiro S, Huber R, Matschiner G, Fritz H, et al. Human beta-tryptase is a ring-like tetramer with active sites facing a central pore. *Nature* 1998; 392(6673): 306-11.
53. Sommerhoff CP. Mast cell tryptases and airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(10 Pt 2): S52-8.
54. Kaminska R, Helisalmi P, Harvima RJ, Naukkarinen A, Horsmanheimo M, Harvima IT. Focal dermal-epidermal separation and fibronectin cleavage in basement membrane by human mast cell tryptase. *J Invest Dermatol* 1999; 113(4): 567-73.
55. Lohi J, Harvima I, Keski-Oja J. Pericellular substrates of human mast cell tryptase: 72,000 dalton gelatinase and fibronectin. *J Cell Biochem* 1992; 50(4): 337-49.

56. Fajardo I, Pejler G. Human mast cell beta-tryptase is a gelatinase. *J Immunol* 2003; 171(3): 1493-9.
57. Kielty CM, Lees M, Shuttleworth CA, Woolley D. Catabolism of intact type VI collagen microfibrils: susceptibility to degradation by serine proteinases. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191(3): 1230-6.
58. Caughey GH, Leidig F, Viro NF, Nadel JA. Substance P and vasoactive intestinal peptide degradation by mast cell tryptase and chymase. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 244(1): 133-7.
59. Tam EK, Caughey GH. Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; 3(1): 27-32.
60. Schwartz LB, Bradford TR, Littman BH, Wintroub BU. The fibrinolytic activity of purified tryptase from human lung mast cells. *J Immunol* 1985; 135(4): 2762-7.
61. Huang C, Wong GW, Ghildyal N, Gurish MF, Sali A, Matsumoto R, et al. The tryptase, mouse mast cell protease 7, exhibits anticoagulant activity in vivo and in vitro due to its ability to degrade fibrinogen in the presence of the diverse array of protease inhibitors in plasma. *J Biol Chem* 1997; 272(50): 31885-93.
62. Stack MS, Johnson DA. Human mast cell tryptase activates single-chain urinary-type plasminogen activator (pro-urokinase). *J Biol Chem* 1994; 269(13): 9416-9.
63. Corvera CU, Dery O, McConalogue K, Bohm SK, Khitin LM, Caughey GH, et al. Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. *J Clin Invest* 1997; 100(6): 1383-93.
64. Mirza H, Schmidt VA, Derian CK, Jesty J, Bahou WF. Mitogenic responses mediated through the proteinase-activated receptor-2 are induced by expressed forms of mast cell alpha- or beta-tryptases. *Blood* 1997; 90(10): 3914-22.
65. Molino M, Barnathan ES, Numerof R, Clark J, Dreyer M, Cumashi A, et al. Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem* 1997; 272(7): 4043-9.
66. Kelso EB, Lockhart JC, Hembrough T, Dunning L, Plevin R, Hollenberg MD, et al. Therapeutic promise of proteinase-activated receptor-2 antagonism in joint inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316(3): 1017-24.

67. Cenac N, Coelho AM, Nguyen C, Compton S, Andrade-Gordon P, MacNaughton WK, et al. Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2. *Am J Pathol* 2002; 161(5): 1903-15.
68. Temkin V, Kantor B, Weg V, Hartman ML, Levi-Schaffer F. Tryptase activates the mitogen-activated protein kinase/activator protein-1 pathway in human peripheral blood eosinophils, causing cytokine production and release. *J Immunol* 2002; 169(5): 2662-9.
69. Weidinger S, Mayerhofer A, Kunz L, Albrecht M, Sbornik M, Wunn E, et al. Tryptase inhibits motility of human spermatozoa mainly by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Hum Reprod* 2005; 20(2): 456-61.
70. Yoshii M, Jikuhara A, Mori S, Iwagaki H, Takahashi HK, Nishibori M, et al. Mast cell tryptase stimulates DLD-1 carcinoma through prostaglandin- and MAP kinase-dependent manners. *J Pharmacol Sci* 2005; 98(4): 450-8.
71. Brown JK, Hollenberg MD, Jones CA. Tryptase activates phosphatidylinositol 3-kinases proteolytically independently from proteinase-activated receptor-2 in cultured dog airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290(2): L259-69.
72. Pang L, Nie M, Corbett L, Sutcliffe A, Knox AJ. Mast cell beta-tryptase selectively cleaves eotaxin and RANTES and abrogates their eosinophil chemotactic activities. *J Immunol* 2006; 176(6): 3788-95.
73. Guyot N, Zani ML, Berger P, Dallet-Choisy S, Moreau T. Proteolytic susceptibility of the serine protease inhibitor trappin-2 (pre-elafin): evidence for tryptase-mediated generation of elafin. *Biol Chem* 2005; 386(4): 391-9.
74. Krishna MT, Chauhan A, Little L, Sampson K, Hawksworth R, Mant T, et al. Inhibition of mast cell tryptase by inhaled APC 366 attenuates allergen-induced late-phase airway obstruction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(6): 1039-45.
75. Hallgren J, Estrada S, Karlson U, Alving K, Pejler G. Heparin antagonists are potent inhibitors of mast cell tryptase. *Biochemistry* 2001; 40(24): 7342-9.
76. Rice KD, Tanaka RD, Katz BA, Numerof RP, Moore WR. Inhibitors of tryptase for the treatment of mast cell-mediated diseases. *Curr Pharm Des* 1998; 4(5): 381-96.



77. Clark JM, Abraham WM, Fishman CE, Forteza R, Ahmed A, Cortes A, et al. Tryptase inhibitors block allergen-induced airway and inflammatory responses in allergic sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(6 Pt 1): 2076-83.
78. Costanzo MJ, Yabut SC, Almond HR, Jr., Andrade-Gordon P, Corcoran TW, De Garavilla L, et al. Potent, small-molecule inhibitors of human mast cell tryptase. Antiasthmatic action of a dipeptide-based transition-state analogue containing a benzothiazole ketone. *J Med Chem* 2003; 46(18): 3865-76.
79. Sendo T, Itoh Y, Goromaru T, Sumimura T, Saito M, Aki K, et al. A potent tryptase inhibitor nafamostat mesilate dramatically suppressed pulmonary dysfunction induced in rats by a radiographic contrast medium. *Br J Pharmacol* 2003; 138(5): 959-67.
80. Oh SW, Pae CI, Lee DK, Jones F, Chiang GK, Kim HO, et al. Tryptase inhibition blocks airway inflammation in a mouse asthma model. *J Immunol* 2002; 168(4): 1992-2000.
81. Wright CD, Havill AM, Middleton SC, Kashem MA, Dripps DJ, Abraham WM, et al. Inhibition of allergen-induced pulmonary responses by the selective tryptase inhibitor 1,5-bis-[4-[(3-carbamimidoyl-benzenesulfonylamino)-methyl]-phenoxy]-pentane (AMG-126737). *Biochem Pharmacol* 1999; 58(12): 1989-96.
82. Sommerhoff CP, Sollner C, Mentele R, Piechottka GP, Auerswald EA, Fritz H. A Kazal-type inhibitor of human mast cell tryptase: isolation from the medical leech *Hirudo medicinalis*, characterization, and sequence analysis. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1994; 375(10): 685-94.
83. He S, Peng Q, Walls AF. Potent induction of a neutrophil and eosinophil-rich infiltrate in vivo by human mast cell tryptase: selective enhancement of eosinophil recruitment by histamine. *J Immunol* 1997; 159(12): 6216-25.
84. He S, Walls AF. Human mast cell tryptase: a stimulus of microvascular leakage and mast cell activation. *Eur J Pharmacol* 1997; 328(1): 89-97.
85. Huang C, De Sanctis GT, O'Brien PJ, Mizgerd JP, Friend DS, Drazen JM, et al. Evaluation of the substrate specificity of human mast cell tryptase beta I and demonstration of its importance in bacterial infections of the lung. *J Biol Chem* 2001; 276(28): 26276-84.

86. Molinari JF, Moore WR, Clark J, Tanaka R, Butterfield JH, Abraham WM. Role of tryptase in immediate cutaneous responses in allergic sheep. *J Appl Physiol* 1995; 79(6): 1966-70.
87. Compton SJ, Cairns JA, Holgate ST, Walls AF. The role of mast cell tryptase in regulating endothelial cell proliferation, cytokine release, and adhesion molecule expression: tryptase induces expression of mRNA for IL-1 beta and IL-8 and stimulates the selective release of IL-8 from human umbilical vein endothelial cells. *J Immunol* 1998; 161(4): 1939-46.
88. Huang C, Friend DS, Qiu WT, Wong GW, Morales G, Hunt J, et al. Induction of a selective and persistent extravasation of neutrophils into the peritoneal cavity by tryptase mouse mast cell protease 6. *J Immunol* 1998; 160(4): 1910-9.
89. He S, Gaca MD, Walls AF. A role for tryptase in the activation of human mast cells: modulation of histamine release by tryptase and inhibitors of tryptase. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286(1): 289-97.
90. Vliagoftis H, Lacy P, Luy B, Adamko D, Hollenberg M, Befus D, et al. Mast cell tryptase activates peripheral blood eosinophils to release granule-associated enzymes. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 135(3): 196-204.
91. Berger P, Compton SJ, Molimard M, Walls AF, N'Guyen C, Marthan R, et al. Mast cell tryptase as a mediator of hyperresponsiveness in human isolated bronchi. *Clin Exp Allergy* 1999; 29(6): 804-12.
92. Barrios VE, Middleton SC, Kashem MA, Havill AM, Toombs CF, Wright CD. Tryptase mediates hyperresponsiveness in isolated guinea pig bronchi. *Life Sci* 1998; 63(26): 2295-303.
93. Frungieri MB, Weidinger S, Meineke V, Kohn FM, Mayerhofer A. Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPAR gamma : Possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(23): 15072-7.
94. Ruoss SJ, Hartmann T, Caughey GH. Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *J Clin Invest* 1991; 88(2): 493-9.
95. Levi-Schaffer F, Piliponsky AM. Tryptase, a novel link between allergic inflammation and fibrosis. *Trends Immunol* 2003; 24(4): 158-61.

96. Pedotti R, DeVoss JJ, Youssef S, Mitchell D, Wedemeyer J, Madanat R, et al. Multiple elements of the allergic arm of the immune response modulate autoimmune demyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(4): 1867-72.
97. Tetlow LC, Woolley DE. Distribution, activation and tryptase/chymase phenotype of mast cells in the rheumatoid lesion. *Ann Rheum Dis* 1995; 54(7): 549-55.
98. Buckley MG, Variend S, Walls AF. Elevated serum concentrations of beta-tryptase, but not alpha-tryptase, in Sudden Infant Death Syndrome (SIDS). An investigation of anaphylactic mechanisms. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(11): 1696-704.
99. Naukkarinen A, Harvima IT, Aalto ML, Horsmanheimo M. Mast cell tryptase and chymase are potential regulators of neurogenic inflammation in psoriatic skin. *Int J Dermatol* 1994; 33(5): 361-6.
100. Kondo S, Kagami S, Kido H, Strutz F, Muller GA, Kuroda Y. Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(8): 1668-76.
101. Jarvikallio A, Naukkarinen A, Harvima IT, Aalto ML, Horsmanheimo M. Quantitative analysis of tryptase- and chymase-containing mast cells in atopic dermatitis and nummular eczema. *Br J Dermatol* 1997; 136(6): 871-7.
102. Caughey GH. New developments in the genetics and activation of mast cell proteases. *Mol Immunol* 2002; 38(16-18): 1353-7.
103. Wong GW, Tang Y, Feyfant E, Sali A, Li L, Li Y, et al. Identification of a new member of the tryptase family of mouse and human mast cell proteases which possesses a novel COOH-terminal hydrophobic extension. *J Biol Chem* 1999; 274(43): 30784-93.
104. Daniels RJ, Peden JF, Lloyd C, Horsley SW, Clark K, Tufarelli C, et al. Sequence, structure and pathology of the fully annotated terminal 2 Mb of the short arm of human chromosome 16. *Hum Mol Genet* 2001; 10(4): 339-52.
105. Jackson NE, Wang HW, Bryant KJ, McNeil HP, Husain A, Liu K, et al. Alternate mRNA splicing in multiple human tryptase genes is predicted to regulate tetramer formation. *J Biol Chem* 2008; 283(49): 34178-87.
106. Akin C, Soto D, Brittain E, Chhabra A, Schwartz LB, Caughey GH, et al. Tryptase haplotype in mastocytosis: relationship to disease variant and diagnostic utility of total tryptase levels. *Clin Immunol* 2007; 123(3): 268-71.

107. Huang R, Abrink M, Gobl AE, Nilsson G, Aveskogh M, Larsson LG, et al. Expression of a mast cell tryptase in the human monocytic cell lines U-937 and Mono Mac 6. *Scand J Immunol* 1993; 38(4): 359-67.
108. Wong GW, Foster PS, Yasuda S, Qi JC, Mahalingam S, Mellor EA, et al. Biochemical and functional characterization of human transmembrane tryptase (TMT)/tryptase gamma. TMT is an exocytosed mast cell protease that induces airway hyperresponsiveness in vivo via an interleukin-13/interleukin-4 receptor alpha/signal transducer and activator of transcription (STAT) 6-dependent pathway. *J Biol Chem* 2002; 277(44): 41906-15.
109. Nakao M, Barrero RA, Mukai Y, Motono C, Suwa M, Nakai K. Large-scale analysis of human alternative protein isoforms: pattern classification and correlation with subcellular localization signals. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(8): 2355-63.
110. Trivedi NN, Tamraz B, Chu C, Kwok PY, Caughey GH. Human subjects are protected from mast cell tryptase deficiency despite frequent inheritance of loss-of-function mutations. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124(5): 1099-105 e1-4.
111. Gurish MF, Boyce JA. Mast cell growth, differentiation, and death. *Clin Rev Allergy Immunol* 2002; 22(2): 107-18.
112. Kitamura Y, Morii E, Jippo T, Ito A. mi-transcription factor as a regulator of mast cell differentiation. *Int J Hematol* 2000; 71(3): 197-202.
113. Morii E, Tsujimura T, Jippo T, Hashimoto K, Takebayashi K, Tsujino K, et al. Regulation of mouse mast cell protease 6 gene expression by transcription factor encoded by the mi locus. *Blood* 1996; 88(7): 2488-94.
114. Ogihara H, Kanno T, Morii E, Kim DK, Lee YM, Sato M, et al. Synergy of PEBP2/CBF with mi transcription factor (MITF) for transactivation of mouse mast cell protease 6 gene. *Oncogene* 1999; 18(32): 4632-9.
115. Morii E, Oboki K, Kataoka TR, Igarashi K, Kitamura Y. Interaction and cooperation of mi transcription factor (MITF) and myc-associated zinc-finger protein-related factor (MAZR) for transcription of mouse mast cell protease 6 gene. *J Biol Chem* 2002; 277(10): 8566-71.
116. Funaba M, Ikeda T, Murakami M, Ogawa K, Tsuchida K, Sugino H, et al. Transcriptional activation of mouse mast cell Protease-7 by activin and transforming

growth factor-beta is inhibited by microphthalmia-associated transcription factor. *J Biol Chem* 2003; 278(52): 52032-41.

117. Morii E, Ogihara H, Oboki K, Kataoka TR, Jippo T, Kitamura Y. Effect of MITF on transcription of transmembrane tryptase gene in cultured mast cells of mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289(5): 1243-6.

118. Funaba M, Ikeda T, Ogawa K, Abe M. Calcium-regulated expression of activin A in RBL-2H3 mast cells. *Cell Signal* 2003; 15(6): 605-13.

119. Funaba M, Ikeda T, Ogawa K, Murakami M, Abe M. Role of activin A in murine mast cells: modulation of cell growth, differentiation, and migration. *J Leukoc Biol* 2003; 73(6): 793-801.

120. Jiang YF, Zhao FD, Li XB, Ning YX, Zhi XL, Qian RZ, et al. Effects of RNA interference-induced tryptase down-regulation in P815 cells on IL-6 and TNF-alpha release of endothelial cells. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008; 9(8): 656-61.

121. van Haelst PL, Timmer JR, Crijns HJ, Kauffman HF, Gans RO, van Doormaal JJ. No long-lasting or intermittent mast cell activation in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol* 2001; 78(1): 75-80.

122. Malamud V, Vaaknin A, Abramsky O, Mor M, Burgess LE, Ben-Yehudah A, et al. Tryptase activates peripheral blood mononuclear cells causing the synthesis and release of TNF-alpha, IL-6 and IL-1 beta: possible relevance to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003; 138(1-2): 115-22.

123. Schwartz LB, Yunginger JW, Miller J, Bokhari R, Dull D. Time course of appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis. *J Clin Invest* 1989; 83(5): 1551-5.

124. van der Linden PW, Hack CE, Poortman J, Vivie-Kipp YC, Struyvenberg A, van der Zwan JK. Insect-sting challenge in 138 patients: relation between clinical severity of anaphylaxis and mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90(1): 110-8.

125. Schwartz LB, Bradford TR, Rouse C, Irani AM, Rasp G, Van der Zwan JK, et al. Development of a new, more sensitive immunoassay for human tryptase: use in systemic anaphylaxis. *J Clin Immunol* 1994; 14(3): 190-204.

126. Schwartz LB, Metcalfe DD, Miller JS, Earl H, Sullivan T. Tryptase levels as an indicator of mast-cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis. *N Engl J Med* 1987; 316(26): 1622-6.

127. Fenger RV, Linneberg A, Vidal C, Vizcaino L, Husemoen LL, Aadahl M, et al. Determinants of serum tryptase in a general population: the relationship of serum tryptase to obesity and asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2012; 157(2): 151-8.
128. Min HK, Moxley G, Neale MC, Schwartz LB. Effect of sex and haplotype on plasma tryptase levels in healthy adults. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(1): 48-51.
129. Lieberman P, Camargo CA, Jr., Bohlke K, Jick H, Miller RL, Sheikh A, et al. Epidemiology of anaphylaxis: findings of the American College of Allergy, Asthma and Immunology Epidemiology of Anaphylaxis Working Group. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 97(5): 596-602.
130. Simons FE. Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(2 Suppl 2): S161-81.
131. Bohlke K, Davis RL, DeStefano F, Marcy SM, Braun MM, Thompson RS. Epidemiology of anaphylaxis among children and adolescents enrolled in a health maintenance organization. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(3): 536-42.
132. Yocum MW, Butterfield JH, Klein JS, Volcheck GW, Schroeder DR, Silverstein MD. Epidemiology of anaphylaxis in Olmsted County: A population-based study. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104(2 Pt 1): 452-6.
133. Lieberman PL. Anaphylaxis. 7 th ed. Adkinsosn NF Jr BB, Busse WW, Holgate ST, Lemanske RF Jr, Simons FER, editor. St. Louis: Mosby; 2009.
134. Kalesnikoff J, Galli SJ. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol* 2008; 9(11): 1215-23.
135. Metcalfe DD, Peavy RD, Gilfillan AM. Mechanisms of mast cell signaling in anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124(4): 639-46.
136. Peavy RD, Metcalfe DD. Understanding the mechanisms of anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; 8(4): 310-5.
137. Finkelman FD. Anaphylaxis: lessons from mouse models. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(3): 506-15.
138. Shanmugam G, Schwartz LB, Khan DA. Prolonged elevation of serum tryptase in idiopathic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(4): 950-1.
139. Travis WD, Li CY, Bergstralh EJ, Yam LT, Swee RG. Systemic mast cell disease. Analysis of 58 cases and literature review. *Medicine (Baltimore)* 1988; 67(6): 345-68.
140. Metcalfe DD. Mast cells and mastocytosis. *Blood* 2008; 112(4): 946-56.

141. Piao X, Bernstein A. A point mutation in the catalytic domain of c-kit induces growth factor independence, tumorigenicity, and differentiation of mast cells. *Blood* 1996; 87(8): 3117-23.
142. Escribano L, Orfao A, Diaz-Agustin B, Villarrubia J, Cervero C, Lopez A, et al. Indolent systemic mast cell disease in adults: immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells and its diagnostic implications. *Blood* 1998; 91(8): 2731-6.
143. Escribano L, Akin C, Castells M, Orfao A, Metcalfe DD. Mastocytosis: current concepts in diagnosis and treatment. *Ann Hematol* 2002; 81(12): 677-90.
144. Akin C, Valent P, Metcalfe DD. Mast cell activation syndrome: Proposed diagnostic criteria. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126(6): 1099-104 e4.
145. Frieri M, Patel R, Celestin J. Mast cell activation syndrome: a review. *Curr Allergy Asthma Rep* 2013; 13(1): 27-32.
146. Valent P. Mast cell activation syndromes: definition and classification. *Allergy* 2012; 68(4): 417-24.
147. Schwartz LB. Clinical utility of tryptase levels in systemic mastocytosis and associated hematologic disorders. *Leuk Res* 2001; 25(7): 553-62.
148. Pelaez Hernández A. Tratado de Alergología. Ergon, editor. Madrid 2007.
149. De la Hoz B, Gonzalez de Olano D, Alvarez I, Sanchez L, Nunez R, Sanchez I, et al. [Guidelines for the diagnosis, treatment and management of mastocytosis]. *An Sist Sanit Navar* 2008; 31(1): 11-32.
150. Schwartz LB, Sakai K, Bradford TR, Ren S, Zweiman B, Worobec AS, et al. The alpha form of human tryptase is the predominant type present in blood at baseline in normal subjects and is elevated in those with systemic mastocytosis. *J Clin Invest* 1995; 96(6): 2702-10.
151. Escribano L, Diaz-Agustin B, Lopez A, Nunez Lopez R, Garcia-Montero A, Almeida J, et al. Immunophenotypic analysis of mast cells in mastocytosis: When and how to do it. Proposals of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA). *Cytometry B Clin Cytom* 2004; 58(1): 1-8.
152. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(5 Pt 2): S77-121.



153. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG, et al. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(1): 309-29.
154. O'Byrne PM. 2007 update of the Global Initiative for Asthma management and prevention: what's new? *Pol Arch Med Wewn* 2008; 118(4): 179-80.
155. Position paper: Allergen standardization and skin tests. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1993; 48(14 Suppl): 48-82.
156. Guida HL, Zorzetto NL. Morphometric and histochemical study of the human vocal muscle. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000; 109(1): 67-71.
157. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000; 132: 365-86.
158. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 2007; 35 (Web Server issue): W71-4.
159. Shi YY, He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res* 2005; 15(2): 97-8.
160. Yoo J, Seo B, Kim Y. SNPAnalyzer: a web-based integrated workbench for single-nucleotide polymorphism analysis. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(Web Server issue): W483-8.
161. Schug J. Using TESS to Predict Transcription Factor Binding Sites in DNA Sequence. Baxevanis AD, editor: J. Wiley and Sons; 2003.
162. Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 1995; 23(23): 4878-84.
163. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 2005; 21(13): 2933-42.
164. de Castro E, Sigrist CJ, Gattiker A, Bulliard V, Langendijk-Genevaux PS, Gasteiger E, et al. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and



ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(Web Server issue): W362-5.

165. Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, Cerutti L, De Castro E, Langendijk-Genevaux PS, et al. The PROSITE database. *Nucleic Acids Res* 2006;34 (Database issue): D227-30.

166. Guida M, Riedy M, Lee D, Hall J. Characterization of two highly polymorphic human tryptase loci and comparison with a newly discovered monkey tryptase ortholog. *Pharmacogenetics* 2000; 10(5): 389-96.

167. Sanz C, Isidoro-Garcia M, Davila I, Moreno E, Laffond E, Avila C, et al. Promoter genetic variants of prostanoid DP receptor (PTGDR) gene in patients with asthma. *Allergy* 2006; 61(5): 543-8.

168. Pascual M, Sanz C, Isidoro-Garcia M, Davila I, Moreno E, Laffond E, et al. (CCTTT)<sub>n</sub> polymorphism of NOS2A in nasal polyposis and asthma: a case-control study. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2008; 18(4): 239-44.

169. Muller CR. Quality control in mutation analysis: the European Molecular Genetics Quality Network (EMQN). *Eur J Pediatr* 2001; 160(8): 464-7.

170. Arriba-Mendez S, Sanz C, Isidoro-Garcia M, Pascual M, Avila C, Davila I, et al. Analysis of 927T > C *CYSLTR1* and -444A > C *LTC4S* polymorphisms in children with asthma. *Allergol Immunopathol* 2008; 36(5): 259-63.

171. Sanz C, Isidro-Garcia M, Davila I, Moreno E, Laffond E, Lorente F. Analysis of 927T> C *CYSLTR1* and -444A > C *LTC4S* polymorphisms in patients with asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2006; 16(6): 331-7.

172. Hamilton MJ, Hornick JL, Akin C, Castells MC, Greenberger NJ. Mast cell activation syndrome: a newly recognized disorder with systemic clinical manifestations. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128(1):147-52 e2.

173. Cuckow PM, Foo AY, Jamal A, Stringer MD. Familial hyperamylasaemia. *Gut* 1997; 40(5): 689-90.

174. Reynolds DS, Gurley DS, Austen KF, Serafin WE. Cloning of the cDNA and gene of mouse mast cell protease-6. Transcription by progenitor mast cells and mast cells of the connective tissue subclass. *J Biol Chem* 1991; 266(6): 3847-53.

175. Kobayashi A, Yamagiwa H, Hoshino H, Muto A, Sato K, Morita M, et al. A combinatorial code for gene expression generated by transcription factor Bach2

and MAZR (MAZ-related factor) through the BTB/POZ domain. *Mol Cell Biol* 2000; 20(5): 1733-46.

176. Funaba M, Ikeda T, Murakami M, Ogawa K, Abe M. Up-regulation of mouse mast cell protease-6 gene by transforming growth factor-beta and activin in mast cell progenitors. *Cell Signal* 2005; 17(1): 121-8.

177. Lee SH, Lee JH, Kim DK. Involvement of MITF-A, an alternative isoform of mi transcription factor, on the expression of tryptase gene in human mast cells. *Exp Mol Med* ;42(5): 366-75.

178. Steingrimsson E, Moore KJ, Lamoreux ML, Ferre-D'Amare AR, Burley SK, Zimring DC, et al. Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences. *Nat Genet* 1994; 8(3): 256-63.

179. Lee SW, Choi JP, Kim HJ, Hong JM, Hur CG. ASPMF: a new approach for identifying alternative splicing isoforms using peptide mass fingerprinting. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377(1): 253-6.

180. Welker P, Wanner R, Zuberbier T, Groneberg DA, Henz BM. Gene expression and regulation of transcription factor activator protein-2 alpha in human mast cells. *Allergy* 2005; 60(8): 1046-52.

181. Libby RT, Gallant JA. The role of RNA polymerase in transcriptional fidelity. *Mol Microbiol* 1991; 5(5): 999-1004.

182. Sydow JF, Cramer P. RNA polymerase fidelity and transcriptional proofreading. *Curr Opin Struct Biol* 2009; 19(6): 732-9.

183. Athanasiadis A, Rich A, Maas S. Widespread A-to-I RNA editing of Alu-containing mRNAs in the human transcriptome. *PLoS Biol* 2004; 2(12): e391.

184. Bass BL, Weintraub H. An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate. *Cell* 1988; 55(6): 1089-98.

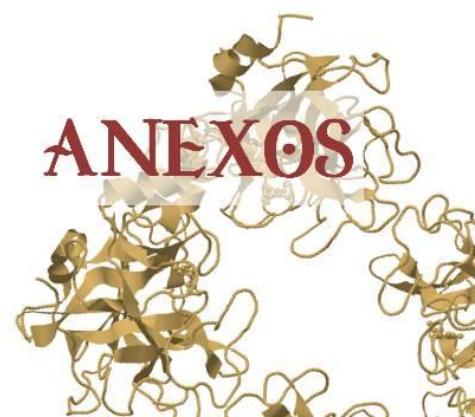
185. Chen CH, Sigman DS. Chemical conversion of a DNA-binding protein into a site-specific nuclease. *Science* 1987; 237(4819): 1197-201.

186. Li JB, Levanon EY, Yoon JK, Aach J, Xie B, Leproust E, et al. Genome-wide identification of human RNA editing sites by parallel DNA capturing and sequencing. *Science* 2009; 324(5931): 1210-3.

187. Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, Edwards YH, Knott TJ, Scott J. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* 1987; 50(6): 831-40.
188. Santos KF, Mazzola TN, Carvalho HF. The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38(10): 1531-41.
189. Rohr KB, Selwood T, Marquardt U, Huber R, Schechter NM, Bode W, et al. X-ray structures of free and leupeptin-complexed human alpha-tryptase mutants: indication for an alpha->beta-tryptase transition. *J Mol Biol* 2006; 357(1): 195-209.
190. Hollenberg MD. Protease-mediated signalling: new paradigms for cell regulation and drug development. *Trends Pharmacol Sci* 1996; 17(1): 3-6.
191. Ricciardolo FL, Steinhoff M, Amadesi S, Guerrini R, Tognetto M, Trevisani M, et al. Presence and bronchomotor activity of protease-activated receptor-2 in guinea pig airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(5): 1672-80.
192. Itoh Y, Sendo T, Oishi R. Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): role of tryptase/PAR-2 in vascular endothelial barrier function. *J Pharmacol Sci* 2005; 97(1): 14-9.
193. Berger P, Tunon-De-Lara JM, Savineau JP, Marthan R. Selected contribution: tryptase-induced PAR-2-mediated Ca(2+) signaling in human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 2001; 91(2): 995-1003.
194. Wang S, Dai Y, Kobayashi K, Zhu W, Kogure Y, Yamanaka H, et al. Potentiation of the P2X3 ATP receptor by PAR-2 in rat dorsal root ganglia neurons, through protein kinase-dependent mechanisms, contributes to inflammatory pain. *Eur J Neurosci*; 36(3): 2293-301.
195. Francis SH, Corbin JD. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol* 1994; 56: 237-72.
196. Lincoln TM, Dey N, Sellak H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* 2001; 91(3): 1421-30.
197. Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 1997; 22(8): 307-12.

198. Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med* 2003; 35(1): 21-7.
199. Browner NC, Sellak H, Lincoln TM. Downregulation of cGMP-dependent protein kinase expression by inflammatory cytokines in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287(1): C88-96.







9- ANEXOS

ANEXO i- Documento de recogida de datos



SERVICIO DE ALERGIA



REMITIR TUBO (10 ml. EDTA - tapón morado) Y PETICIÓN AL LABORATORIO DE ALERGIA

Nº LABORATORIO:

Nº SUERO:

FECHA:

NOMBRE y APELLIDOS:  
 Nº HISTORIA:  
 EDAD:  
 SEXO: V / M

DOCTOR:

CONTROL:  SI  
 NO

ESTUDIO:  β-Lactámicos  ASMA  
 POLIPOSIS  OTROS

PRUEBAS CUTÁNEAS:

Negativas  Ácaros  Hongos  Alimentos  
 Pendientes  Epitelios  Pólenes  Otros.....

ASMA:  NO  SI

RINITIS:  NO  SI

Intermitente   
 Persistente  Leve   
 Moderada   
 Grave

Intermitente   
 Persistente  Leve   
 Moderada   
 Grave

EDAD DE APARICIÓN DEL ASMA:.....años

ANTECEDENTES Atopia  1er grado Asma  1er grado Rinitis  1er grado Poliposis  1er grado  
 FAMILIARES:  2 grado  2 grado  2 grado  2 grado  
 Sin AF  MADRE ATOPIA  MADRE ASMA

INTOLERANCIA AINES: NO  SI:  Respiratoria  POLIPOSIS:  SI  
 Cutánea  NO

INMUNOTERAPIA: SI  NO  Especificar:

TRATAMIENTO CON CORTICOIDES:  SI CORTICOIDE ORAL:   
 NO CORTICOIDE INHALADO:

IgE TOTAL:

OBSERVACIONES:





# ÍNDICE DE TABLAS





## 10~ ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> identidad entre las secuencias de las triptasas humanas (245 aminoácidos) descritas (17).....	9
<b>Tabla 2:</b> procesos biológicos en los que la triptasa está implicada (12) .....	34
<b>Tabla 3:</b> Diferencias en la estructura entre las distintas isoformas descritas del gen <i>TPSAB1</i> .....	45
<b>Tabla 4:</b> diferencias en estructura entre las distintas formas del gen <i>TPSB2</i> descritas. ....	46
<b>Tabla 5:</b> niveles de triptasa en suero según las distintas patologías. Tomado de Schwartz, 2011.....	52
<b>Tabla 6:</b> criterios propuestos para el diagnóstico de SAM (144).....	56
<b>Tabla 7:</b> relación de los niveles de triptasa determinados en la paciente y las fechas en que fueron realizadas las pruebas. A: niveles de triptasa en reagudización del cuadro clínico.....	72
<b>Tabla 8:</b> denominación y secuencia de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR .....	87
<b>Tabla 9:</b> nombre y secuencia utilizados para la amplificación de la región promotora del gen <i>TPSAB1</i> .....	89
<b>Tabla 10:</b> denominación y secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR para amplificar la región del exón 4. ....	91
<b>Tabla 11:</b> Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del cDNA.....	92
<b>Tabla 12:</b> nombre y secuencia utilizados para la secuenciación de la región promotora del gen <i>TPSAB1</i> .....	97
<b>Tabla 13:</b> oligonucleótidos para <i>Real Time</i> PCR utilizados en el análisis de expresión cuantitativa. ....	103
<b>Tabla 14:</b> programa de amplificación de RT-PCR. ....	104
<b>Tabla 15:</b> características clinico-biológicas de los grupos control incluidos en cada uno de los estudios.....	124

<b>Tabla 16:</b> polimorfismos de un único nucleótido (SNP) estudiados en la región comprendida entre el exón 5 y el exón 6.....	129
<b>Tabla 17:</b> distribución alélica y genotípica de los SNP nuevos en la región comprendida entre el exón 5 y el exón 6.....	130
<b>Tabla 18:</b> distribución de alelos y genotipos detectados en nuestra población de los SNP previamente descritos.....	132
<b>Tabla 19:</b> polimorfismos de un único nucleótido previamente descritos en la región comprendida entre el exón 5 y el exón 6.....	135
<b>Tabla 20:</b> combinaciones obtenidas por el software SNPalyzer, utilizando los algoritmos EM, Clark y pseudo-Gibbs.....	136
<b>Tabla 21:</b> combinación de haplotipos obtenidos por clonación de los amplicones de PCR previos a la secuenciación .....	137
<b>Tabla 22:</b> proporciones de los individuos del total de la población de estudio (pacientes y controles) que presentaban cada uno de los genotipos determinados por estudios de RFLP con la enzima de restricción <i>EcoRV</i> .....	139
<b>Tabla 23:</b> media de los niveles de triptasa, niveles de IgE, del logaritmo de IgE y p de Fisher respecto a la distribución alélica.....	139
<b>Tabla 24:</b> distribuciónalélicarespecto a los resultados de pruebas cutáneas positivas frente a los distintos aeroalérgenos estudiados. ....	141
<b>Tabla 25:</b> niveles de triptasa ( $\mu\text{g/L}$ ) en pacientes y controles de acuerdo a la distribución de la forma $\alpha$ .....	141
<b>Tabla 26:</b> nuevos SNP hallados en la paciente y comparación con el resto de pacientes y grupo control. ....	143
<b>Tabla 27:</b> patrones diferenciales de acuerdo con los sitios polimórficos en la región promotora y los polimorfismos de esta región característicos de la paciente 1. ....	144
<b>Tabla 28:</b> SNP descritos en la paciente4que determinan la pérdida de la capacidad de unión de estos factores de transcripción.....	146
<b>Tabla 29:</b> SNP descritos en el análisis completo del gen <i>TPSAB1</i> en la familia de estudio.....	148
<b>Tabla 30:</b> genotipo de la familia de estudio para los SNP y polimorfismos previamente descritos estudiados en el gen <i>TPSAB1</i> . ....	149

<b>Tabla 31:</b> posición, rs y localización de los nuevos SNP estudiados en la región del exón 5 y 6 del gen <i>TPSAB1</i> .....	150
<b>Tabla 32:</b> haplotipos más comunes obtenidos en el probando del estudio frente al grupo control.....	151
<b>Tabla 33:</b> datos obtenidos en la amplificación por medio de RT-PCR para el gen endógeno y el gen del estudio.....	154
<b>Tabla 34:</b> resultados del $\Delta Ct$ y $\Delta\Delta Ct$ , así como el número de veces que cada individuo expresa el gen de triptasa con respecto a la referencia de controles tomada.....	154
<b>Tabla 35:</b> modificaciones previamente descritas en los aminoácidos y polimorfismo responsable.....	156
<b>Tabla 36:</b> modificaciones en los aminoácidos y dominios previamente descritas. .	158



# ÍNDICE DE FIGURAS







## 11~ ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Alineamiento de las distintas formas de $\beta$ -triptasa en el que se evidencian las diferencias en su secuencia de aminoácidos.....	10
<b>Figura 2.</b> Procesamiento de la forma inmadura de triptasa a la forma madura en el interior del gránulo del mastocito.....	11
<b>Figura 3.</b> Alineamiento de las secuencias de las distintas triptasas (obtenido de <a href="http://www.uniprot.org/uniprot">http://www.uniprot.org/uniprot</a> ). .....	15
<b>Figura 4.</b> Activación de $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ -triptasa. Las protriptasas inactivas que se encuentran en el retículo endoplasmático pueden seguir vías reguladoras o vías secretoras constitutivas. La $\beta$ -triptasa se procesa por eliminación del propéptido dando lugar a una forma catalíticamente activa que, junto con la participación de la heparina, estabiliza el tetrámero en la forma completamente activa y es almacenada en los gránulos secretores junto con otros mediadores. La $\gamma$ -triptasa se activa por eliminación de un propéptido, de tal manera que permanece asociada a la membrana. La $\alpha$ -triptasa posee una variación génica que previene la eliminación del propéptido; por lo tanto es, secretada directamente, junto con la pro- $\beta$ -triptasa residual. Tras la secreción, las triptasas $\beta$ maduras forman parte del torrente circulatorio y son detectadas mediante inmunoanálisis, junto con la pro- $\alpha$ y pro- $\beta$ . En la liberación del gránulo, la $\gamma$ -triptasa permanece anclada a la superficie externa de la membrana del mastocito(26). .....	17
<b>Figura 5.</b> Representación de la estructura tridimensional del tetrámero de triptasa; los monómeros que la constituyen se disponen en las esquinas de un rectángulo plano, con sus centros activos orientados hacia el centro. Tomado de Hallgren y cols, 2006 (12). .....	20
<b>Figura 6.</b> Modelo que describe la relación entre el tetrámero de $\beta$ triptasa humana y los productos de la inactivación espontánea. Tomado de Schechter y cols(41). .....	24
<b>Figura 7.</b> Posición relativa de los genes que codifican la triptasa en el cromosoma 16. ....	39

<b>Figura 8.</b> Esquema del gen <i>TPSAB1</i> . Los exones se representan con cajas rojas y se numeran del 1 al 6; entre ellos, con una línea pálida, se representan los intrones. En ambos extremos se representan con flechas azules la región del promotor y 1000 pares de bases en sentido 3´. Las cajas inferiores representan las regiones 5´ UTR y 3´ UTR.....	40
<b>Figura 9.</b> Diferencias en la secuencia nucleotídica entre los alelos que codifican los distintos tipos de triptasa(13). .....	42
<b>Figura 10.</b> Splicing alternativo del gen <i>TPSAB1</i> descrito en <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/</a> .....	44
<b>Figura 11.</b> Splicing alternativo del gen <i>TPSAB1</i> descrito en <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/</a> .....	45
<b>Figura 12. A:</b> isoformas del gen <i>TPSG1</i> . <b>B:</b> isoformas del gen <i>TPSD1</i> . Obtenido de <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/</a> .....	47
<b>Figura 13.</b> Mecanismos subyacentes a la anafilaxia (130).....	55
<b>Figura 14.</b> Algoritmo diagnóstico en la mastocitosis del adulto en paciente sin lesión cutánea y con cuadros recurrentes de anafilaxia o colapso vascular. De la Hoz y cols (149).....	73
<b>Figura 15. A:</b> realización de pruebas cutáneas intraepidérmicas. <b>B:</b> resultado positivo de las mismas. <b>C:</b> batería de aeroalérgenos más habitual .....	80
<b>Figura 16.</b> Fundamento del procedimiento llevado a cabo por el <i>MagNA Pure Compact</i> (Roche) tomado del <i>MagNA Pure Compact Operator´s Manual</i> . .....	84
<b>Figura 17.</b> Procedimiento de extracción y purificación de ARN seguido con el <i>kit RiboPure-Blood</i> (Ambion).....	85
<b>Figura 18.</b> Representación esquemática de las regiones de anillamiento en el gen <i>TPSAB1</i> para los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR. Las cajas de color naranja se representan los exones y las líneas de color pálido representan los intrones. ....	88
<b>Figura 19.</b> Representación del gen <i>TPSAB1</i> y el lugar donde anillan los oligonucleótidos, representados con flechas azules. Los exones se representan como cajas de color naranja. ....	90
<b>Figura 20.</b> Resumen del método seguido en el procedimiento de clonación. Tomado del manual del fabricante de <i>StrataClone PCR Cloning Kit</i> . ....	93

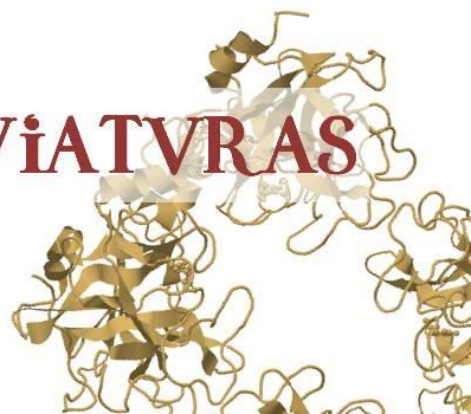
<b>Figura 21.</b> Secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyser.....	97
<b>Figura 22.</b> Secuencia del gen <i>TPSAB1</i> de un individuo control utilizando el programa Chromas.Pro 1.32 .....	98
<b>Figura 23.</b> Secuencia del fragmento del exón 4 del gen <i>TPSAB1</i> (Visualizada con el programa Chromas.Pro 1.32) de un individuo control heterocigoto para la posición del SNP 363C>T que se señala con la punta de flecha. ....	99
<b>Figura 24: A:</b> patrón de bandas para el marcador de DNA de 1 Kb de Invitrogen. La imagen representa un marcador en un gel de electroforesis al 0,9% y cada banda cuenta con 0,5 µg. El gel fue teñido con bromuro de etidio. <b>B:</b> Separación de los fragmentos resultantes de la digestión. El primer patrón de bandas (Mk) corresponde con el marcador, la muestra número 1 con un fragmento del exón 4 del gen <i>TPSAB1</i> sin digerir (1028 pares de bases) y la muestra 2 que presenta 3 bandas es el resultado del reconocimiento de la enzima EcoRV del sitio de restricción en uno de los alelos (individuo heterocigótico), de tal manera que resultan una banda de 1028 pb (alelo no digerido) y dos del alelo digerido (678 y 350 pares de bases) ....	100
<b>Figura 25.</b> Resumen del procedimiento seguido para la obtención de la población de cDNA total a partir de ARN siguiendo las instrucciones del fabricante. ....	102
<b>Figura 26.</b> Gráfico obtenido en la búsqueda del gen <i>TPSAB1</i> en la base UCSC Genome Browser.....	105
<b>Figura 27.</b> Visualización de los resultados de la búsqueda del gen <i>TPSAB1</i> en AceView.....	106
<b>Figura 28.</b> Resultados obtenidos con la búsqueda del gen <i>TPSAB1</i> en la base de datos GeneCards.....	108
<b>Figura 29.</b> Resultados obtenidos en la base dbSNP del ncbi para el gen <i>TPSAB1</i> ....	109
<b>Figura 30. A:</b> interfaz de entrada del software Primer3Plus. <b>B:</b> pantalla de salida para los oligos diseñados para la secuencia del gen <i>TPSAB1</i> .....	110
<b>Figura 31.</b> Alineamiento de una secuencia en Vector NTI 10 resultante de amplificación por PCR y dos secuencias obtenidas de bases de datos de los genes <i>TPSAB1</i> y <i>TPSB2</i> .....	111
<b>Figura 32.</b> Esquema en Vector NTI del gen <i>TPSAB1</i> .....	112

<b>Figura 33.</b> Esquema representativo de los factores de transcripción obtenidos para el promotor del gen <i>TPSAB1</i> y la localización de su unión a lo largo de la secuencia. ....	116
<b>Figura 34.</b> Resultados obtenidos en el análisis <i>in silico</i> de la proteína codificada por el gen <i>TPSAB1</i> . ....	118
<b>Figura 35.</b> Diagrama de cajas que refleja la mediana y dispersión de la edad en función del sexo. ....	121
<b>Figura 36.</b> A: frecuencias de niveles de triptasa ( $\mu\text{g/L}$ ) en la muestra de estudio. B: dispersión de los datos de niveles de triptasa en función del sexo. ....	122
<b>Figura 37.</b> Frecuencias del logaritmo de IgE en la muestra de estudio. ....	123
<b>Figura 38. A:</b> Distribución de la positividad frente a aeroalérgenos en el grupo de pacientes. <b>B:</b> Distribución de los pacientes según la gravedad del asma. ....	125
<b>Figura 39.</b> Ejemplo de alineamiento de las secuencias de los distintos individuos. En color amarillo se indica una similitud del 100%, otros colores indican homologías de menor grado. ....	126
<b>Figura 40.</b> Representación esquemática de los polimorfismos nuevos estudiados en la región comprendida entre el exón 5 y el exón 6. ....	127
<b>Figura 41.</b> Electroferograma (Chromas Lite) obtenido tras amplificación y secuenciación de la región intrónica 1 en el que se incluye el exón 1. La flecha indica el SNP descrito. ....	128
<b>Figura 42.</b> Representación esquemática del gen <i>TPSAB1</i> con los SNP descritos por Guida et al en el año 2000 (2). Los polimorfismos están señalados en sus posiciones concretas. Los exones se representan mediante cajas rojas y, entre ellas, los intrones con una línea más pálida. ....	131
<b>Figura 43.</b> Distribución del alelo mutado de cada uno de los SNP estudiados en la región comprendida entre el exón 1 y el exón 2 del gen. En rosa se colorea la frecuencia de los polimorfismos correspondientes a los intrones y en rojo las correspondientes a los exones. ....	133
<b>Figura 44.</b> Frecuencias genotípicas de los distintos SNP en la región del intrón 1 y exón 2, en degradación de color, en color vino se representa la frecuencia de individuos con la mutación en heterocigosis y en color rosa, los individuos con el	

polimorfismo en homocigosis. En color claro se representa la frecuencia de individuos homocigotos para el alelo normal.....	134
<b>Figura 45.</b> Electroforesis tras digestión con <i>EcoRV</i> . MK: marcador de tamaño, S: muestras sin digerir, D: muestras digeridas. 1D: se observan una banda, por lo que el genotipo establecido para estos individuos carece de la forma alfa; 2D: el resultado de la digestión proporcionó tres bandas, por lo que su genotipo se define como portador de la forma alfa. ....	138
<b>Figura 46.A:</b> Proporción encontrada en la población de estudio del RFLP. En rosa se representa la proporción de la población que presenta el sitio de restricción reconocido por la enzima <i>EcoRV</i> , mientras que en rojo se representa la proporción de la población que no presenta dicho sitio. <b>B:</b> Distribución de los individuos atendiendo al genotipo y al grupo de pertenencia. ....	140
<b>Figura 47.</b> Árbol genealógico que muestra la relación de parentesco entre los individuos incluidos en esta parte del estudio.....	142
<b>Figura 48.</b> Análisis del tamaño de los ADNc del paciente 1 (1) y uno de los controles (2) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. ....	153
<b>Figura 49.</b> Alineamiento de las secuencias proteicas de pacientes y controles con las secuencias referencia. ....	155
<b>Figura 50.</b> Representación esquemática de los dominios proteicos obtenidos en la paciente 1 y la comparación con los individuos control. En la proteína de la paciente, el dominio representado hacia abajo indica pérdida mientras que en el esquema del control las posiciones indicadas en recuadros con líneas discontinuas indican que no se han detectado. ....	159



# ABREVIATURAS







## 12~ ABREVIATURAS

**μM:** micromolar

**ΔΔCt, ΔCt:** método comparativo Ct

**μL:** microlitro

**3'UTR:** 3' *Untranslated Region*. Región 3 no traducida.

**5'UTR:** 5' *Untranslated Region*. Región 3 no traducida.

**A:** Adenosina

**Å:** Amstrong

**aa:** aminoácido.

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico.

**ADNc:** ADN complementario

**AHR:** *Aryl hydrocarbon receptor*

**Ala (A):** Alanina

**AMG-126737:** 1,5-bis-{4-[(3-carbamimidoyl-benzenesulfonylamino)-methyl]-phenoxy}-pentane. Potente inhibidor de triptasa.

**ANOVA:** Análisis de la Varianza.

**Anticuerpo B12**

**Anticuerpo G4**

**Anticuerpo G5**

**AP2:** *Activator Protein 2*

**APC-366:** *N-(1-hydroxy-2-naphthoyl)-L-arginyl-L-prolinamide hydrochloride*.

Inhibidor de triptasa

**Arg (R):** Arginina

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**Asn (N):** Asparagina

**Asp (D):** Ácido aspártico

**ATS:** *American Thoracic Society*

**BABIM:** bis(5-amidino-2-benzimidazolyl)methane.

**BACs:** *Bacterial Artificial Chromosome*

**Bhlh:** Basic Helix-Loop-Helix domain

**BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool*

**BMMC:** *Bone Marrow derived Mast Cell*, Mastocitos derivados de médula ósea

**C:** Citosina

**C1INH:** *C1 inhibitor*, inhibidor C1.

**C2H2:** acetileno

**C3:** Complemento C3

**C4:** Complemento C4

**cAMP, AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico.

**CCAAT:** (*Cytidine-Cytidine-Adenosine-Adenosine-Thymidine*) Enhancer Binding Protein Zeta

**CD117:** *c-kit receptor*. Receptor de citokinas expresado en la superficie de células stem hematopoyéticas.

**CD11c:** Integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit).

**CD2:** cluster of differentiation 2. Molécula de adhesión molecular en la superficie de células T y células natural killer (NK)

**CD25:** cadena alfa del receptor de IL-2.

**CD35 o CR1:** Erythrocyte complement receptor 1.

**CD45 o PTPCR:** Protein tyrosine phosphatase, CD45 antigen.

**CD59:** Glicoproteína conocida como MAC-inhibitory protein (MAC-IP), membrane inhibitor of reactive lysis (MIRL), or protectin.

**CD63:** CD63 antigen

**CD69:** human transmembrane C-Type lectinprotein.

**CGRP:** Calcitonin-Gene-Related Peptide, peptide relacionado con el gen de la calcitonina.

**CH100:** Complemento Hemolítico Total.

**c-kit:** receptor tyrosine kinase, receptor tirosina kinasa.

**CP2:** Cysteine Proteinase 2

**Ct:** *threshold cycle*. Ciclo umbral

**CTCF:** CCCTC-binding factor or 11-zinc finger protein

**CTF1:** CCAAT Transcription Factor 1

**CTSC:** catepsina C

**Ct<sub>TBP</sub>:** Ciclo umbral para gen TBP

**Ct<sub>TPS</sub>:** Ciclo umbral para gen TPS

**Cys (C):** Cisteína

**dbSNP:** Single Nucleotide Polymorphism Database

**dNTP:** dextrirribonucleótidos.

**DPPI:** dipeptidylpeptidase I.

**E47 o TCF3:** E2A immunoglobulin enhancer-binding factors E12/E47

**EAACI:** European Academy of Allergy and Clinical Immunology.

**E-boxes:** secuencia CANNTG en el promotor de un gen.

**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético

**EGR:** Early growth response proteins

**ERK1/2:** extracellular signal-regulated kinase isoforms 1 and 2, Kinasas reguladas por señal extracelular isoformas 1 y 2.

**ET1:** Endotelina 1

**EVI-1:** Ecotropic Virus Integration Site-1

**FcγRIII:** low-affinity receptor for immunoglobulin G, receptor de baja afinidad de IgG.

**FcεRI:** high-affinity IgE receptor, receptor de alta afinidad de IgE.

**FEV1:** Forced Expiratory Volume, Volumen espirado forzado

**FVC:** Forced Vital Capacity, Capacidad vital forzada.

**G:** Guanosina

**GINA:** Global Initiative for Asthma

**Gln (Q):** Glutamina

**Glyc (G):** Glicina

**GMPc:** Guanidín monofosfato cíclico

**HATH1:** gen implicado en el desarrollo y diferenciación del epitelio intestinal.

**HCl:** Ácido Clorhídrico.

**HDL:** *High Density Lipoprotein*, Lipoproteínas de alta densidad.

**HGF:** *Hepatocyte growth factor*, factor de crecimiento de hepatocitos.

**His (H):** Histidina

**HMC-1:** *Human Mast Cell-1*

**HOX:** *Homeobox*

**Hoxa9:** *Homeobox protein HOX-A9*

**hTMT:** *human Transmembrane Tryptase gene*.

**HW:** *Hardy-Weinberg equilibrium*, equilibrio de Hardy-Weinberg

**h- $\alpha$ I:** *human  $\alpha$ I-tryptase*.

**h- $\alpha$ II:** *human  $\alpha$ II-tryptase*.

**h- $\beta$ I:** *human  $\beta$ I-tryptase*.

**h- $\beta$ II:** *human  $\beta$ II-tryptase*.

**h- $\beta$ III:** *human  $\beta$ III-tryptase*.

**h- $\gamma$ I:** *human  $\gamma$ I-tryptase*.

**h- $\gamma$ II:** *human  $\gamma$ II-tryptase*.

**h- $\epsilon$ :** *human  $\epsilon$ -tryptase*.

**ICAM:** *Intercellular Adhesion Molecule*, Molécula de Adhesión Intercelular

**IgE:** Inmunoglobulina E

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1 $\beta$

**IL-6:** Interleucina-6

**IL-8:** Interleucina-8

**Ile (I):** Isoleucina

**IVS:** polimorfismo del intrón

**K:** potasio

**Kb:** Kilobases

**KCl:** Cloruro potásico

**kDa:** Kilodaltons

**KU/L:** kilounidades/litro

**KU812:** *Human myelogenous leukaemia cell line*, Línea celular leucemia mieloide humana.

**LB:** Luria-Broth Medium, medio LB

**LBP32:** *Lipopolysaccharide-binding protein-32*

**LDTI:** *Leech-Derived Tryptase Inhibitor*

**Leu (L):** Leucina

**Lys (K):** Lisina

**MAP kinasas:** *Mitogen-activated protein kinases*, Protein kinasas activadas por mitógenos.

**MATH-1:** factor de transcripción de tipo bHLH

**MAZR:** *myc-associated zinc-finger protein related factor*.

**MC<sub>C</sub>:** mastocitos triptasa negativos

**mcg/L,  $\mu$ g/L:** microgramos/litro

**MC<sub>T</sub>:** mastocitos de las mucosas

**MC<sub>TC</sub>:** mastocitos de los tejidos conectivos

**Meis1a:** *Myeloid Ecotropic Integration Site 1a*

**MEK:** *mitogen-activated protein kinase kinase*.

**mEq/L:** miliequivalentes/litro.

**mg/mL:** miligramos/mililitro

**Mg:** Magnesio

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de Magnesio

**MITF:** *Microphthalmia-associated transcription factor*, Factor de transcripción asociado a microftalmia.

**Mk:** marcador de peso molecular

**mL:** mililitro

**mM:** milimolar

**mMCP-11 o Pssr 34:** Mouse Mast Cell Protease gene

**Mmcp-6:** Mouse Mast Cell Protease-6

**mMCP-6:** Mouse Mast Cell Protease-6 gene

**Mmcp-7:** Mouse Mast Cell Protease-7

**mMCP-7:** Mouse Mast Cell Protease-7 gene

**M-MLV RT:** *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*

**MOL-6131:** inhibidor de triptasa

**mTMT o Prss31:** *Mouse Transmembrane Tryptase gene*.

**myf3:** *MRF family member*

**MyoD:** Proteína clave en la regulación de la diferenciación muscular.

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information

**ng/μL:** nanogramos/microlitro.

**°C/s:** °C por segundo

**p/v:** peso/volumen

**P1:** residuo en N-terminal de la cadena de aminoácidos.

**P1':** residuo en C-terminal de la cadena de aminoácidos.

**P2, P3, P4...:** residuos más allá del N-terminal y P1. Numeración sucesiva.

**P2', P3', P4'...:** residuos más allá del C-terminal y P1. Numeración sucesiva.

**PAR:** *Protease Activator Receptor*, Receptor Activado por Proteasa.

**PAS:** dominio proteico cuya función es de señalización

**PAX-2, 4, 5, 6, 8, 9:** Factores de transcripción específicos de tejidos que contienen dominios pareados y generalmente un homodominio parcial o completo.

**PBX:** *Polymer Bonded Explosives*

**PC20:** dosis o concentración

**PCR:** Polymerase Chain Reaction, Reacción en cadena de la polimerasa.

**PEB2:** *polyomavirus enhancer binding protein 2*.

**PEF:** *Expiratory Flow Rate*, Flujo espiratorio máximo.

**pg/cell:** picogramos por célula.

**PGS:** *Prostaglandins*, Prostaglandinas

**PHM:** *peptide histidine-methionine*, Péptido histidina-metionina.

**Poly(A) tail:** múltiples adenosinas monofosfatos en la cadena de ARNm

**Pro (P):** Prolina

**PSE:** *Proximal sequence element*.

**RANTES:** *Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted*,

Regulador de la activación normal de células T expresadas y secretadas.

**RFLP:** *Restriction Fragment Length Polymorphism*. Polimorfismo de Fragmento de Restricción.

**RFX:** Motif bound by regulatory factor X.

**RNasa:** Ribonucleasa

**rs:** identificación única en dbSNP

**RT-PCR:** *Real Time-PCR*, PCR a Tiempo Real

**RWJ-56423:** inhibidor de triptasa cuya fórmula molecular es  $C_{20}H_{26}N_6O_4S$ .

**SAM:** Síndrome Activación Mastocitaria

**SCF:** *Stem Cell Factor*, Factor de crecimiento celular

**Ser (S):** Serina

**Sharp2:** split and hairy-related protein-2

**SNP:** *Single Nucleotide Polymorphism*, Polimorfismo de un Único Nucleótido.

**snRNA:** *Small Nuclear Ribonucleic Acid*, ARN pequeño nuclear

**SRY:** *Sry-box (Sox) transcription factors*

**T:** Timina

**TAE:** Tris-Acetate-EDTA buffer

**Taq:** *Thermus aquaticus*

**TBP:** *TATA- Binding Protein gene*.

**TF:** *Transcription Factor*, Factor de Transcripción.

**TFCP2L2:** *Alpha-globin transcription factor CP2*

**TGF- $\beta$ 1:** *Transforming Growth Factor  $\beta$* , Factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1.

**Thr (T):** Treonina

**Tm:** *Melting Temperature*.

**TNF $\alpha$ :** *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* . Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$

**TPS:** *Tryptase*

**TPSAB1:** *Tryptase alpha/ beta-1*

**TPSB2:** *Tryptase beta-2*

**TPSD1:** *Tryptase delta-1*

**TPSG1:** *Tryptase gamma-1*

**Tris:** tris(hydroxymethyl)aminomethane.

**Tyr (Y):** Tirosina

**U:** unidades

**uORF:** *Upstream Open Reading Frame*

**UV:** Ultravioleta.

**Val (V):** Valina

**VIP:** *Vasoactive Intestinal Polypeptide*, Polipéptido Vasoactivo Intestinal

**X-box:** *X-box binding protein 1*.

**X-Gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

**Y-box:** *Y-box binding protein*

**$\mu$ g/L, mcg/L:** microgramos/litro

