

DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA, GINECOLOGÍA Y PEDIATRÍA



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

**Estudio de polimorfismos e interacciones génicas de los  
genes *IL1A, IL1B, IL1R, IL1RA, IL4R A, IL12, IFNG, TGFB1,*  
*TNFA, IL2, IL4, IL6, IL10* en pacientes con asma**

Memoria presentada por Dña. Juana Reyes Padrón Morales para optar al  
grado de Doctor.

2010



El Prof. Dr. D. Félix Lorente Toledano, la Prof<sup>a</sup>. Dra. Doña. María Isidoro García y el Prof. Dr. D. Ignacio J. Dávila González,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “Estudio de polimorfismos e interacciones génicas de los genes IL1A, IL1B, IL1R, IL1RA, IL4R A, IL12, IFNG, TGFB1, TNFA, IL2, IL4, IL6, IL10 en pacientes con asma.”, que presenta la licenciada en Biología Doña Juana Reyes Padrón Morales 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 Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Salamanca a 12 de Enero de 2010.

Fdo: Dr. Félix Lorente Toledano

Fdo: Dra. María Isidoro García.

Fdo: Dr. Ignacio J. Dávila González



*Dedico este trabajo a Alejandro, por su cariño y su paciencia*



## Agradecimientos

Al Dr. Félix Lorente Toledano, director de esta tesis, por crear este estupendo equipo de trabajo con unas cualidades científicas y humanas excepcionales que me ha enseñado mucho de muchas cosas.

A la Dra. María Isidoro-García, directora de esta tesis. No tengo palabras para expresar lo agradecida que me siento por haber tenido la posibilidad de contar con su apoyo profesional, científico y personal.

Al Dr. Ignacio Dávila González, director de esta tesis, por guiarme en los aspectos clínicos de este trabajo, confiar siempre en mi capacidad de trabajo y animarme en todo momento.

A la Cati y Marien, por enseñarme a ser una más en el equipo de trabajo, y ofrecerme su amistad.

A Virginia, por su apoyo, su ayuda, su amistad y su buen humor.

A todos los que trabajan en el Laboratorio de Inmunoalergia, David, Laura, Marta, María Luisa, en especial a Carmen Lorenzo, por la alegría que da al laboratorio.

A todo el personal del Servicio de Inmunoalergia, gracias a los facultativos por colaborar en el reclutamiento de los pacientes. Al resto del personal, gracias por recibirme todos los días con una sonrisa y ayudarme siempre que lo he necesitado.

A todos mis compañeros del Servicio de Bioquímica, en especial a David, Belén García, Carlos, Itziar y Piedad. Por ser parte de mi familia durante estos años.

A los pacientes, gracias a cuya colaboración nada de esto sería posible.

A mi familia, por dárme todo y enseñarme a aprovecharlo.



*"La ignorancia genera confianza más frecuentemente que el conocimiento. Son aquellos que saben poco, y no esos que saben más, quienes tan positivamente afirman que este o aquel problema nunca será resuelto por la ciencia".*

Charles Darwin



# CONTENIDO:

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1.1	DEFINICIÓN	3
1.2	EPIDEMIOLOGÍA	5
1.3	ETIOLOGÍA	5
	FACTORES INDIVIDUALES	6
	FACTORES AMBIENTALES	7
1.4	FISIOPATOLOGÍA	10
	INFLAMACIÓN DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS	10
	HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL (HRB)	15
	OBSTRUCCIÓN AL FLUJO AÉREO	16
	REESTRUCTURACIÓN DE LA VÍA RESPIRATORIA BRONQUIAL	16
1.5	EL ASMA COMO ENFERMEDAD GENÉTICA	17
	ESTRATEGIAS DE BÚSQUEDA DE LOS GENES DEL ASMA	18
	PRINCIPALES GENES ASOCIADOS AL ASMA	20
	LOS GWA Y EL ASMA	28
	EPIGENÉTICA Y ASMA	29
	FARMACOGENÓMICA EN EL ASMA	30
1.6	CITOCINAS y SUS RECEPTORES	33
	IL-1	33
	IL-1RN	37
		VIII

IL-1R1	38
IL-2	40
IL-4	41
IL-4R $\alpha$	43
IL-6	44
IL-10	47
IL-12	49
IFN- $\gamma$	50
TGF- $\beta$	52
TNF- $\alpha$	53
<b>2. HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	<b>61</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>65</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>69</b>
4.1 ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES	69
CONTROLES	76
PACIENTES	76
4.2 ANÁLISIS MOLECULAR	77
OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE ADN	77
EXTRACCIÓN DE ADN	77
ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS	81
CONTROL DE CALIDAD	94
	IX

4.3 ESTUDIO ESTADÍSTICO DE ASOCIACIÓN GENÉTICA ENTRE CASOS Y CONTROLES	104
ANÁLISIS DESCRIPTIVO	104
ANÁLISIS BIVARIANTE Y MULTIVARIANTE	105
ANÁLISIS DE COMBINACIONES GÉNICAS	107

## **5. RESULTADOS 111**

5.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA UNIVARIANTE	111
DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN CONTROL	111
DESCRIPCIÓN DE LOS PACIENTES	111
DISTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN LA POBLACIÓN CONTROL	116
5.2 ESTUDIO BIVARIANTE Y MULTIVARIANTE DE POLIMORFISMOS	116
ASMA	116
POLIMORFISMOS ASOCIADOS AL ASMA ATÓPICA	119
ASMA NO ATÓPICA	121
ANTECEDENTES FAMILIARES DE ASMA O ENFERMEDADES ALÉRGICAS	123
SENSIBILIZACIÓN ALÉRGICA	124
5.2.4 GRAVEDAD DEL ASMA	128
LA TRÍADA DE LA ASPIRINA	130
5.3 ESTUDIO DE HAPLOTIPOS Y DIPLÓTIPOS	131
GEN DE <i>IL1B</i> (Posiciones -511/3961)	131
GEN <i>TNFA</i> (-308/-238)	133
GEN <i>TGFB1</i> (c10/c25)	135
GEN <i>IL4</i> (-1098/-590/-33)	136
GEN <i>IL2</i> (-330/166)	136

GEN IL6 (-174/nt565)	139
GEN (IL 10 -1082/-819/-592)	139
5.4 COMBINACIONES GÉNICAS EN EL ASMA ALÉRGICA	140
5.5 COMBINACIONES GENICAS EN ASMA NO ALÉRGICA	142
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>147</b>
GENES DEL “CLUSTER” DE LA INTERLEUCINA 1	147
GEN DE LA INTERLEUCINA 2	151
GEN DE LA INTERLEUCINA 4 Y LA SUBUNIDAD A DE SU RECEPTOR	154
GEN DE LA INTERLEUCINA 6	156
GEN DE LA INTERLEUCINA 10	158
GEN DE LA INTERLEUCINA 12	159
GEN DEL INTERFERON GAMMA	161
GEN DEL FACTOR DEL CRECIMIENTO B1	162
GEN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA	163
COMBINACIONES GÉNICAS	168
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>173</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>177</b>

## TABLA DE ABREVIATURAS

ADR $\beta$ 2: Receptor  $\beta$ 2 adrenérgico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Arg: Arginina

ARNm: ARN mensajero

ALOX5: araquidónico-5-lipooxigenasa

CVC: coeficiente de validación cruzada

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

GATA 3: Factor de transcripción activador específico de la transcripción

Gln: Glutamina

GMCSF: factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos

GWA: estudios de asociación de todo el genoma

IFN: Interferón

IgE: Inmunoglobulina E.

IL: Interleucina

Lt: Leucotrienos

LTA: Linfotoxina alfa

MDC: Quimiocinas derivadas de Macrófagos

nm: nanómetro

OR: Odds Ratio

PAF: Factor activador de plaquetas

Pb: pares de base

SNP: Polimorfismo

SSP-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa específica de sitio

STAT3: Transductor y activador de la transmisión de señal

TAE: tampón Tris-Acético-EDTA

TARC: Quimiocinas reguladas y activadas en el tiempo

TBA: coeficiente de viabilidad del modelo

TGFB1: Factor transformante del crecimiento B1

Th: T colaborador

TLR: receptores tipo "toll"

Tnf: Factor de necrosis tumoral

μL: microlitro

UV: ultravioleta

V-CAM-1: Molécula de adhesión vascular tipo I

$\chi^2$ : Chi cuadrado



# INTRODUCCIÓN

---





# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 DEFINICIÓN

El asma se define como una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias en la que intervienen numerosas células y elementos celulares [1]. La inflamación crónica se asocia con hiperreactividad bronquial que conduce a episodios recurrentes de sibilancias, disnea, opresión torácica y tos, principalmente nocturnos o a primeras horas de la mañana. Estos episodios normalmente se encuentran asociados a una obstrucción variable al flujo aéreo, total o parcialmente reversible, ya sea espontáneamente o por la acción farmacológica.

El asma bronquial es la enfermedad crónica más común en niños y adolescentes. Podría considerarse como un síndrome complejo que engloba diversos fenotipos y cuya etiología multifactorial ha sido atribuida a la interacción entre numerosos genes y entre estos genes y el ambiente [2]. Debido a la variedad de fenotipos que pueden presentar los pacientes asmáticos, el estudio de esta enfermedad se basa en los siguientes aspectos:

- **SÍNTOMAS y SIGNOS CLÍNICOS:** se objetivan mediante la utilización de cuestionarios estandarizados previamente validados como por ejemplo el del Estudio Internacional del Asma y Alergia en la Infancia (ISAAC) [3]. Los principales síntomas que se utilizan en este tipo de cuestionarios son [4]:
  - **TOS:** la tos puede aparecer en distintas fases de la crisis. Al inicio de los síntomas se debe fundamentalmente al estrechamiento de las vías respiratorias y a la irritación de receptores vagales debida a la presencia de mediadores inflamatorios. En fases más avanzadas, como la fase de

resolución, aparece debida a la mucosidad que obstruye las vías respiratorias, y se asocia a la expectoración.

- **DISNEA:** se define como la sensación de falta de aire. Se debe a un aumento del trabajo de la musculatura, que intenta mantener el flujo de aire a pesar de la obstrucción, a los cambios en la distensibilidad pulmonar y a la irritación de los receptores nerviosos.
  - **SIBILANCIAS:** son consecuencia del paso de aire a gran velocidad a través de las vías respiratorias. De los signos típicos del asma, es el más característico, es decir, el que mejor se asocia al diagnóstico de asma.
  - **OPRESIÓN TORÁCICA:** es una sensación que aparece con mucha frecuencia, consecuencia de la irritación de receptores vagales pulmonares y de la limitación del flujo aéreo. Es el síntoma más frecuentemente descrito por los pacientes.
- **ATOPIA:** mecanismo inmunológico que presentan las enfermedades atópicas. Estas enfermedades constituyen un grupo de trastornos alérgicos con un componente hereditario mediados por el efecto y acción de anticuerpos IgE. De forma diagnóstica se determina mediante la positividad de las pruebas cutáneas intraepidérmicas (*prick*) realizadas con una batería de aeroalérgenos adecuada a la zona de residencia del paciente.
  - **HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL:** la hiperreactividad bronquial es una sensibilidad anormal de las vías respiratorias que se expresa como un aumento de la obstrucción al flujo aéreo tras la exposición a estímulos indirectos sobre el músculo liso bronquial, que provocan la liberación de mediadores inflamatorios, o directos. Se trata de una

característica típica del asma, aunque también puede darse en otras patologías como la rinitis alérgica, la fibrosis quística y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, entre otras [5]. El diagnóstico de hiperreactividad bronquial se lleva a cabo mediante la prueba de la metacolina, que consiste en evaluar la respuesta a la metacolina (broncoconstrictor colinérgico) para determinar qué dosis del fármaco provoca disminución de la función pulmonar. Puede realizarse también con histamina o con estimulantes indirectos como la adenosina, entre otros.

## **1.2 EPIDEMIOLOGÍA**

Se estima que en todo el mundo existen aproximadamente unos 300 millones de asmáticos. La distribución a nivel mundial no es homogénea (Figura1), de manera que la prevalencia oscila entre 1-18% en los distintos países [6]. La Organización Mundial de la Salud estima que al año se producen unas 250.000 muertes debidas al asma, lo que supone un 1% del total de muertes por enfermedad [7]. Los costes que supone el asma son sustanciosos, tanto en términos económicos: costes de tratamiento y hospitalización; como sociales: se estima que el asma es una causa frecuente de ausencia del puesto de trabajo en muchos países industrializados, incluyendo Australia, Suecia, el Reino Unido y los Estados Unidos [8].

## **1.3 ETIOLOGÍA**

Hoy en día se desconocen las causas concretas que desencadenan el asma. Se piensa que la variedad de fenotipos asmáticos observados viene determinada por la interacción entre la predisposición genética del individuo y los factores ambientales a los que se vea expuesto a lo largo de su vida.

En la patología asmática, los factores de riesgo pueden dividirse en los que causan la aparición del asma y los que desencadenan sus síntomas. La aparición del asma se atribuye principalmente a factores individuales, como el componente genético, el sexo o la obesidad, mientras que las crisis y el agravamiento posterior se asocian fundamentalmente a factores ambientales [9].

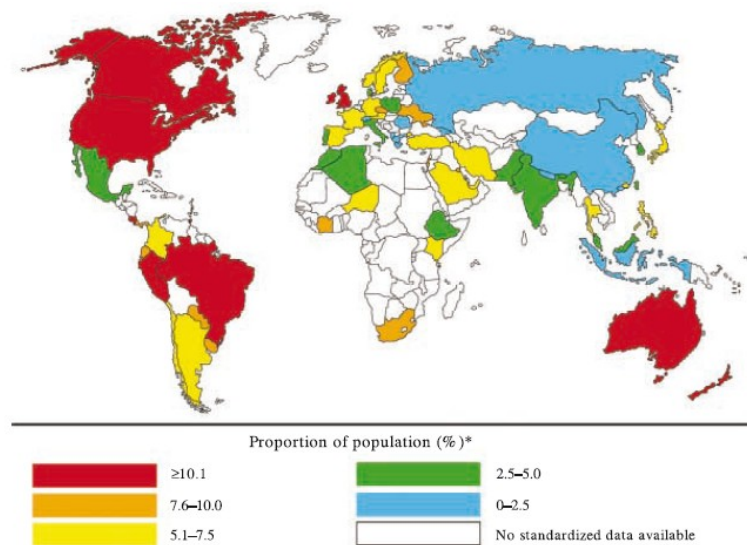


Figura 1. Mapa mundial de la prevalencia del asma [6]

## FACTORES INDIVIDUALES

### FACTORES GENÉTICOS

El asma tiene un componente hereditario complejo. Los datos actuales muestran que existen numerosos genes involucrados en esta patología, y que, además, son variables en función del grupo étnico que se estudie [10]. El componente genético del asma será abordado en profundidad más adelante.

## **OBESIDAD**

Se considera que la obesidad es un factor de riesgo para la aparición del asma, sin que se conozca realmente la relación entre ambos procesos. Se ha sugerido que determinados mediadores moleculares, que se encuentran elevados en los pacientes con obesidad, como las leptinas podrían afectar a la función de las vías respiratorias e incrementar la probabilidad de desarrollar asma [11].

## **SEXO**

Antes de los 14 años de edad, la prevalencia del asma en niños es casi el doble que en niñas [12]. A medida que avanza el desarrollo, esta diferencia entre sexos desaparece. Sin embargo, en adultos, la prevalencia de asma es superior en mujeres que en hombres.

## **FACTORES AMBIENTALES**

### **EXPOSICIÓN A ALÉRGENOS**

Numerosos estudios epidemiológicos y clínicos han demostrado la asociación de los niveles de IgE con la gravedad del asma [13], así como con la respuesta inicial y posteriores al contacto de la mucosa con el alérgeno que induce su síntesis. La formación de IgE frente a aeroalérgenos es muy escasa hasta los 2-3 años de vida, pero aumenta a medida que avanza la infancia y la adolescencia.

Más del 80% de los niños con asma presentan pruebas cutáneas positivas frente a determinados aeroalérgenos [14], siendo éstos el precipitante más común de sus síntomas, tanto en niños como en adultos. Los más comunes, además de los más relacionados con el asma, son los ácaros domésticos, los pólenes, la cucaracha, la *Alternaria* y los epitelios de

animales, en especial del gato. La importancia de cada uno de ellos depende del área geográfica, las condiciones particulares de la vivienda y la convivencia con los animales domésticos, en definitiva, del grado de exposición del individuo.

## **FACTORES MATERNOS**

Una de las principales hipótesis que explican la aparición de la inflamación en la mucosa de las vías respiratorias es un desequilibrio en la respuesta Th2-Th1 (“T helper 2- T helper-1”: linfocitos T colaboradores de tipo 2 o de tipo 1), con una desviación hacia la respuesta Th2 en individuos atópicos. Se ha observado que, durante el embarazo y en el cordón umbilical de los recién nacidos existe un predominio acentuado de citocinas del tipo Th2 [15]. Se piensa que un predominio demasiado acentuado de este tipo de citocinas podría determinar la aparición posterior de asma, alergia o ambos en el individuo.

## **INFECCIONES**

El papel de las infecciones en la patogenia del asma es un tema muy controvertido. Algunos autores defienden la “hipótesis higienista”, según la cual los estrictos hábitos higiénicos de las sociedades occidentalizadas han provocado el aumento en la prevalencia del asma en estas zonas geográficas [16]. Este aumento de la higiene provocaría que los individuos no se vean expuestos a infecciones microbianas tempranas como el sarampión o la hepatitis A entre otras, ni que se produzca una colonización temprana del tracto gastrointestinal [17]. Éste hecho, junto a un mayor uso/abuso de antibióticos disminuiría la capacidad de desarrollar la respuesta Th1, desviándola hacia Th2, induciendo de ese modo la respuesta atópica. Esta hipótesis se basa en la menor incidencia de asma en individuos que han utilizado pocos antibióticos, se han criado en granjas, asistido a guarderías en etapas tempranas de la vida o pertenecido a familias numerosas [18]. Todas estas circunstancias tendrían como consecuencia



una estimulación adecuada de la respuesta Th1, y por tanto, un desarrollo normal del sistema inmune. Sin embargo, ésta hipótesis está en desacuerdo con el hecho de que determinadas infecciones víricas [19] o bacterianas [20, 21] sean importantes agentes desencadenantes de la descompensación en pacientes con asma.

## **TABACO**

Existen numerosos estudios que asocian la exposición al mismo con el desarrollo y la gravedad del asma bronquial, juzgando la gravedad en función de la frecuencia de aparición de los ataques y el número de visitas al servicio de urgencias [22]. Además, también se asocia pérdida de la capacidad de responder al tratamiento [23].

## **CONTAMINANTES**

El papel que juega la contaminación ambiental en el asma es controvertido [24]. Se ha demostrado una relación entre la aparición de crisis con incrementos en los niveles de polución ambiental, lo que podría estar relacionado con un incremento general de la respuesta inflamatoria, además de un aumento en la alergenidad de las sustancias ambientales [25, 26].

## **DIETA**

Uno de los factores ambientales que más ha cambiado en los últimos años, coincidiendo con el aumento de la prevalencia del asma, son los hábitos nutricionales asociados al modo de vida occidental. Estos cambios han implicado una disminución del consumo de productos lácteos, verdura y fruta y, por tanto, una modificación en la ingestión de nutrientes importantes como vitaminas, carotenos y magnesio, acompañados de un aumento en el

consumo de grasas saturadas. Este cambio de los hábitos alimenticios puede haber contribuido al aumento de la prevalencia el asma y las enfermedades atópicas [27].

### **1.4 FISIOPATOLOGÍA**

El asma se produce como consecuencia de una alteración inflamatoria en las vías respiratorias, en la que se encuentran involucrados gran cantidad de mediadores que provocan una serie de cambios fisiopatológicos característicos [9].

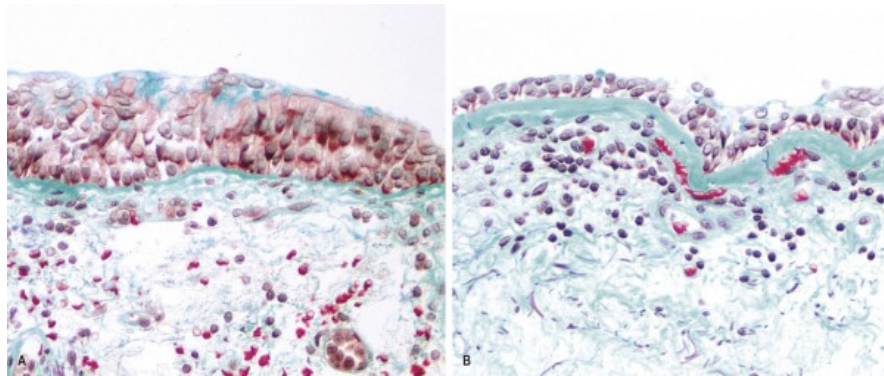
La característica patológica más evidente del asma es la obstrucción al flujo aéreo, consecuencia tanto de la contracción del músculo liso debida a la hiperreactividad, como de la inflamación de la pared de los bronquios. Debe tenerse en cuenta la reestructuración de las paredes de las vías respiratorias, frecuente en pacientes asmáticos, que tiene como consecuencia una obstrucción más o menos irreversible del flujo aéreo.

### **INFLAMACIÓN DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS**

Las manifestaciones clínicas del asma son enormemente variables, pero en todos los casos existe una inflamación de la mucosa de las vías respiratorias. Se trata de un fenómeno persistente, aun cuando los síntomas sean esporádicos, sin que se encuentre una relación estrecha entre la gravedad del asma y el grado de inflamación [28]. La inflamación afecta a todo el tracto respiratorio, pero los efectos más pronunciados tienen lugar en la zona intermedia del árbol bronquial. El patrón de inflamación de las vías respiratorias parece ser similar en todas las formas clínicas, independientemente de si el desencadenante es o no alérgico. En ella intervienen, además de los componentes del epitelio bronquial, numerosos tipos celulares que liberan gran cantidad y variedad de mediadores inflamatorios.

## CÉLULAS INFLAMATORIAS

En la mucosa bronquial de los individuos asmáticos (Figura 2) se encuentra un patrón de infiltración celular en el que se observan numerosos mastocitos activados, gran cantidad de eosinófilos activados y linfocitos Th2, que liberan mediadores que contribuyen a los síntomas.

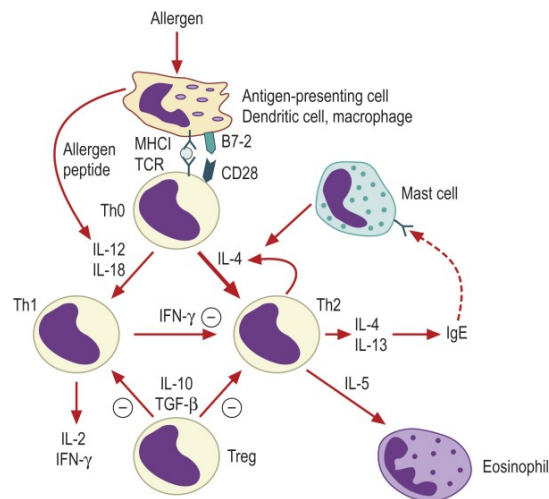


**Figura 2.** Especímenes de mucosa bronquial de un sujeto sin asma (izquierda): el epitelio está intacto, no existe engrosamiento de la membrana basal ni infiltración celular; De un sujeto con asma leve (derecha): se observa hiperplasia de las células caliciformes en el epitelio bronquial y un engrosamiento de la membrana basal y presencia de infiltrados celulares [9].

- **Mastocitos:** desempeñan un papel fundamental en la sintomatología del asma [29]. Son las células responsables de iniciar la respuesta broncoconstrictora frente a los alérgenos y, probablemente, al resto de los estímulos que desencadenan el asma, como el ejercicio, la hiperventilación o las infecciones virales. Ejercen esta acción especialmente cuando se produce su activación a través de receptores de alta afinidad para la IgE (FcεRI), que originan la liberación de diversos mediadores inflamatorios preformados, como la histamina, una rápida síntesis de novo de otros mediadores, como los leucotrienos cisteinílicos o la prostaglandina D<sub>2</sub> y la síntesis, a lo largo de horas, de determinadas citocinas como la IL-4 o la IL-5 [30].

- **Eosinófilos:** la infiltración por eosinófilos es una característica de la inflamación alérgica. Estas células liberan gran cantidad de proteínas básicas y radicales libres que provocan la hiperreactividad bronquial y el daño epitelial característicos del asma [31]. Son reclutados al epitelio bronquial gracias a moléculas de adhesión expresadas en el epitelio bronquial como la molécula de adhesión vascular (VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*), cuya expresión se ve incrementada por la IL-4, y que interacciona selectivamente con las moléculas de integrina VLA-4 (*Very Late Antigen 4*), presentes en la superficie de los eosinófilos [32]. La migración puede deberse a estímulos quimiotácticos de mediadores lipídicos como los leucotrienos, el factor activador plaquetario (PAF), o las quimiocinas como RANTES o las eotaxinas 1-3.
- **Linfocitos T:** los linfocitos T son las células responsables de la coordinación de la respuesta inflamatoria en el asma mediante la liberación de citocinas específicas que tiene como consecuencia el reclutamiento de eosinófilos y el mantenimiento de mastocitos en la vía aérea. En la inflamación de las vías respiratorias los linfocitos T expresan un patrón de citocinas tipo Th2 (Figura 3), que se caracteriza por la síntesis y secreción de IL4, IL5, IL9 e IL13 [33]. Un incremento en la actividad Th2 puede deberse a un fallo en la actividad de los linfocitos T reguladores, responsables del correcto equilibrio entre las respuestas Th1 y Th2, de manera que se ha propuesto que las enfermedades alérgicas podrían deberse a un fallo en la regulación de estas respuestas, con una desviación hacia la secreción de citocinas de tipo Th2, responsables del fenotipo característico de estas enfermedades [9].
- **Células dendríticas:** son células presentadoras de antígenos que se encuentran en el epitelio del tracto respiratorio y desempeñan un papel fundamental en la inducción y el mantenimiento de las respuestas inducidas por alérgenos [34]. Su función consiste

básicamente en capturar antígenos de la luz del tracto respiratorio y presentarlos a los Linfocitos T para desencadenar y amplificar la respuesta inflamatoria. Dependiendo de las citocinas que produzcan, condicionan la respuesta de los linfocitos Th.



**Figura 3.** Regulación de la diferenciación de linfocitos Th0 hacia Th1/Th2 [35]

- **Macrófagos:** se encuentran en gran número en las vías respiratorias y pueden ser activados por los alérgenos a través de los receptores de baja afinidad para IgE (FcεRII) [36]. Liberan gran variedad de mediadores que amplifican la respuesta alérgica, como TNF-α y el óxido nítrico, NO [37]. Además, también actúan como células presentadoras de antígenos, procesando a los alérgenos para su presentación a los linfocitos T.
- **Neutrófilos:** aparecen en gran número en el esputo de algunos pacientes con asma grave [38] y en biopsias de pacientes que fallecen debido al asma [39]. El papel que juegan los neutrófilos no está claro: se piensa que su incremento puede deberse a la terapia con glucocorticoides [40], aunque se ha llegado a hablar de una asma neutrofílica [41], con características propias, en contraposición con el asma habitual, con infiltración eosinofílica. En este tipo de pacientes se ha definido un nuevo subtipo

de citocinas Th17, células productoras de IL-17 e IL-22, que podrían contribuir al asma grave con infiltración neutrofílica [42].

## **MOLÉCULAS MEDIADORAS DE LA INFLAMACIÓN**

Se han identificado alrededor de 100 mediadores diferentes involucrados en la inflamación característica del asma en las vías respiratorias [43]. Generalmente, cada uno de estos mediadores presenta múltiples efectos que actúan sinérgica o antagónicamente entre sí, de manera que los efectos finales que ejercen dependerán del total de mediadores liberados.

- **Quimiocinas:** son importantes en el reclutamiento de células inflamatorias al epitelio bronquial. Las eotaxinas son selectivas para los eosinófilos, mientras que las quimiocinas reguladas y activadas en el timo (TARC) y las quimiocinas derivadas de macrófagos (MDC) reclutan fundamentalmente linfocitos T [44].
- **Leucotrienos cisteínicos:** los leucotrienos (LT) C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, y E<sub>4</sub> son potentes mediadores con efecto broncoconstrictor y proinflamatorio, derivados fundamentalmente de los mastocitos y eosinófilos. Se trata de un grupo de moléculas cuya inhibición se ha asociado con una mejora en la función pulmonar y los síntomas del asma [45].
- **Citocinas:** son los mediadores principales, que dirigen la respuesta inflamatoria en el asma y determinan su gravedad. La interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) son citocinas clave en esta regulación al amplificar la respuesta inflamatoria, así como el factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), que facilita la supervivencia de los eosinófilos en las vías respiratorias. El patrón predominante es el de las citocinas de tipo Th2, como la IL4, que determina el desarrollo hacia linfocitos Th2 y participa en el cambio de isotipo

hacia IgE, la IL5, requerida para la diferenciación y supervivencia de los eosinófilos, y la IL13, que también participa en la síntesis de IgE.

- **Histamina:** es liberada por los mastocitos y contribuye a la broncoconstricción de las células musculares del epitelio bronquial, entre otras acciones.
- **Óxido Nítrico (NO):** es un potente vasodilatador producido fundamentalmente por la acción de las sintasas del NO inducible de las células epiteliales de la mucosa (NOs) [46]. El NO exhalado se utiliza para monitorizar la efectividad del tratamiento del asma, debido a que se ha observado su asociación con la presencia de inflamación [47].
- **Prostaglandina D2:** es un mediador liberado principalmente por los mastocitos e involucrado en el reclutamiento de las células Th2, la broncoconstricción, el aumento de la permeabilidad vascular y la producción de moco [48].

## **ELEMENTOS DEL EPITELIO BRONQUIAL**

Las células propias del epitelio bronquial, como las células epiteliales, endoteliales, fibroblastos, células musculares y terminales nerviosos, constituyen una importante fuente de mediadores inflamatorios como citocinas y mediadores de origen lipídico [49].

## **HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL (HRB)**

Se trata de una característica universal del asma [50], pero no exclusiva, ya que, como se ha comentado, también se observa en otras patologías, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la fibrosis quística e incluso en individuos sanos [5]. Consiste en un fenómeno multifactorial variable entre los individuos, que siempre conlleva una disminución

del calibre bronquial debido a la hiperplasia y/o hipertrofia del músculo liso, al daño epitelial y al desequilibrio del sistema nervioso autónomo (fundamentalmente colinérgico), lo que genera una gran resistencia al flujo de aire[51].

## **OBSTRUCCIÓN AL FLUJO AÉREO**

El resultado final de los mecanismos comentados, relacionados con la inflamación de las vías respiratorias no es otro que la obstrucción al flujo aéreo, que generalmente es reversible con tratamientos broncodilatadores.

## **REESTRUCTURACIÓN DE LA VÍA RESPIRATORIA BRONQUIAL**

Como consecuencia de la potente respuesta inflamatoria originada en el asma pueden producirse alteraciones estructurales en la pared bronquial, que modifican irreversiblemente su funcionalidad. Dichas alteraciones son numerosas y muy variadas, siendo las más frecuentes y destacables:

- **Modificaciones en el epitelio:** se produce una descamación del epitelio respiratorio debida a la apoptosis de las células epiteliales [52]. El grado de destrucción del epitelio va a depender fundamentalmente de la gravedad del asma [53].
- **Subepitelio:** Se produce una acumulación anormal de colágeno (tipos I, III y V), tenascina, fibronectina y proteoglicanos, que se manifiestan como depósitos hialinos de distribución homogénea en la membrana basal [54].
- **Glándulas mucosas:** Se produce hiperplasia y/o hipertrofia de las glándulas mucosas y células caliciformes, provocando un aumento en la secreción de mucina y un aumento en la viscosidad de las secreciones [55].



- La mayor vascularización de la mucosa provoca angiogénesis [56], es decir, generación de nuevos vasos permanentes.
- Degeneración del cartílago bronquial y fibrosis pericartilaginosa [52].

### **1.5 EL ASMA COMO ENFERMEDAD GENÉTICA**

Hace tiempo que el asma es considerada una enfermedad con un importante componente genético. Los primeros estudios que mostraban evidencias de dicha asociación datan de los primeros años del siglo XX [57-60]. Estos estudios fueron de gran importancia, ya que demostraron el componente familiar del asma, pero no fue hasta la década de los 80 cuando aparecieron los estudios de segregación familiar y los estudios de gemelos mono y dizigóticos [61], que intentaron determinar el patrón de herencia mediante el análisis de la distribución del asma y sus manifestaciones clínicas en función de los distintos modelos establecidos, así como la influencia de factores ambientales en este fenotipo. Los resultados de este tipo de estudios pusieron de manifiesto que el asma no sigue un típico patrón de herencia mendeliano, sino que se trata de un síndrome multifactorial consecuencia de la interacción entre diversos factores genéticos y ambientales [62].

A partir de la década de los 90 empieza a entenderse el asma como una enfermedad compleja, en la que existen diferentes y muy variados fenotipos caracterizados por complicados mecanismos moleculares, por lo que cabe pensar que diversos genes ejercen su influencia en esta patología. El desarrollo de la genética molecular ha permitido la identificación de numerosos genes que parecen intervenir en el asma. El abordaje de la búsqueda de estos genes se ha realizado, fundamentalmente, utilizando dos estrategias básicas: estudios de ligamiento en todo el genoma y estudios de asociación con genes candidatos.

## ESTRATEGIAS DE BÚSQUEDA DE LOS GENES DEL ASMA

### ESTUDIOS DE LIGAMIENTO

Los estudios de ligamiento consisten en analizar familias con individuos enfermos: se examinan marcadores genéticos distribuidos a lo largo de todo el genoma y se analiza si alguno de ellos es más frecuente en los individuos afectados. El descubrimiento de una región de este tipo, generalmente de 20-30 millones de pares de bases (pb), sugiere que algún gen en dicha región estaría actuando como un factor predisponente a la enfermedad, de manera que los genes presentes en esa zona se convertirían en candidatos para un estudio más exhaustivo de su relación con la patología. La ventaja de este tipo de estudios es que permiten identificar nuevos genes y rutas implicadas en patologías complejas [63]. Sin embargo, los resultados de este tipo de análisis son enormemente complejos: la mayoría de las regiones cromosómicas ligadas al asma o alguno de sus síntomas presentan múltiples *loci* candidatos, cada uno de los cuales podría ejercer un pequeño efecto en la susceptibilidad [63]. Un ejemplo es la región 5q31-33; se trata de una región asociada al asma por estudios de ligamiento que han sido replicados en numerosas ocasiones [64] y que contiene 14 genes asociados con el asma, la atopia o fenotipos intermedios, como *IL4*, *IL13*, *CD14* o *ADRB2*. Una desventaja notable de los estudios de ligamiento es la dificultad que han mostrado para ser replicados, así como su restringida capacidad para poner de manifiesto *loci* que confieran un riesgo de efecto limitado en la patología [65].

### ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN

Los estudios de asociación de genes candidatos se basan en el estudio de una selección de genes que intervienen en la patogenia de la enfermedad. Consisten en la comparación de frecuencias alélicas y genotípicas entre grupos de controles y pacientes sin relación de

parentesco. Se trata de un método con mayor capacidad para detectar polimorfismos que confieran un riesgo moderado a la enfermedad que los estudios de ligamiento [65], sin necesidad de aumentar el tamaño de la muestra del estudio. Otra ventaja de los estudios de asociación es el diseño: resulta más sencillo reclutar para el estudio un número alto de individuos afectados que no tengan relación de parentesco que obtener la colaboración de familias; además, a igual número de individuos emparentados y no emparentados, el poder estadístico es mayor si los individuos no son familia [66]. Un problema de los estudios de asociación casos-controles deriva de la posible estratificación de las poblaciones, que podría resultar en diferencias en las frecuencias alélicas entre casos y controles que no se debieran a la enfermedad [63]. Esto se resuelve utilizando métodos estadísticos que permiten detectar y corregir desviaciones poblacionales[64].

### **ESTUDIOS DE GENOMA COMPLETO (GWA: *Genome Wide Association analysis*)**

Más recientemente, los avances a gran escala de la genómica han hecho que se desarrollen nuevas estrategias para abordar el estudio de las enfermedades complejas. Este es el caso de los estudios de asociación de todo el genoma, en los que se analizan cientos de miles de polimorfismos repartidos por todo el genoma en busca de las variantes que se asocien a la susceptibilidad de padecer una determinada enfermedad compleja o alguno de sus síntomas. Éste tipo de estudios es posible gracias a que actualmente se comercializan micromatrices (*microchips*) que permiten “*genotipar*” un gran número de polimorfismos de un único nucleótido (SNP) en miles de pacientes y controles con un coste asumible [67]. Las ventajas de este tipo de estudios son evidentes, ya que permitirían conocer genes candidatos asociados a un riesgo moderado [65]. Sin embargo, como con cualquier nuevo método de análisis, es importante no sobreestimar la capacidad de los estudios de genoma completo. En primer lugar, hay que ser muy estricto en la selección de la población que se va a estudiar. Es

necesario que los pacientes estén uniformemente caracterizados, con criterios clínicos que no presenten ambigüedad. Dicha caracterización es especialmente importante en los controles. Los individuos que se seleccionen como controles en este tipo de estudios deben tener unas características fenotípicas muy bien caracterizadas. En segundo lugar, para obtener un poder estadístico aceptable, que permita identificar los alelos de interés, es necesario contar con muestras de gran tamaño y herramientas estadísticas que permitan procesar esa enorme cantidad de datos. La necesidad de trabajar con muestras tan grandes, independientemente de su buena caracterización, puede llevar a una enorme heterogeneidad en las influencias ambientales, muy importantes en el desarrollo de enfermedades complejas como el asma [68]. Además, en este tipo de estudios se obtienen una gran cantidad de datos cuyo análisis estadístico supone un importante reto para los bioinformáticos, que deben desarrollar herramientas estadísticas que permitan distinguir resultados verdaderamente positivos, estableciendo controles que eviten los falsos positivos. Otra desventaja que presentan los GWA, común a los análisis presentados en este texto, es que muchos de los resultados que se obtienen no han podido ser replicados, por lo que deben ser tomados con precaución. El desarrollo de este tipo de herramientas ha supuesto una revolución en el estudio de las enfermedades complejas, sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora no han sido tan relevantes como se esperaba, ya que en la mayoría de ellos se encuentran asociaciones que ya se conocían [69].

## **PRINCIPALES GENES ASOCIADOS AL ASMA**

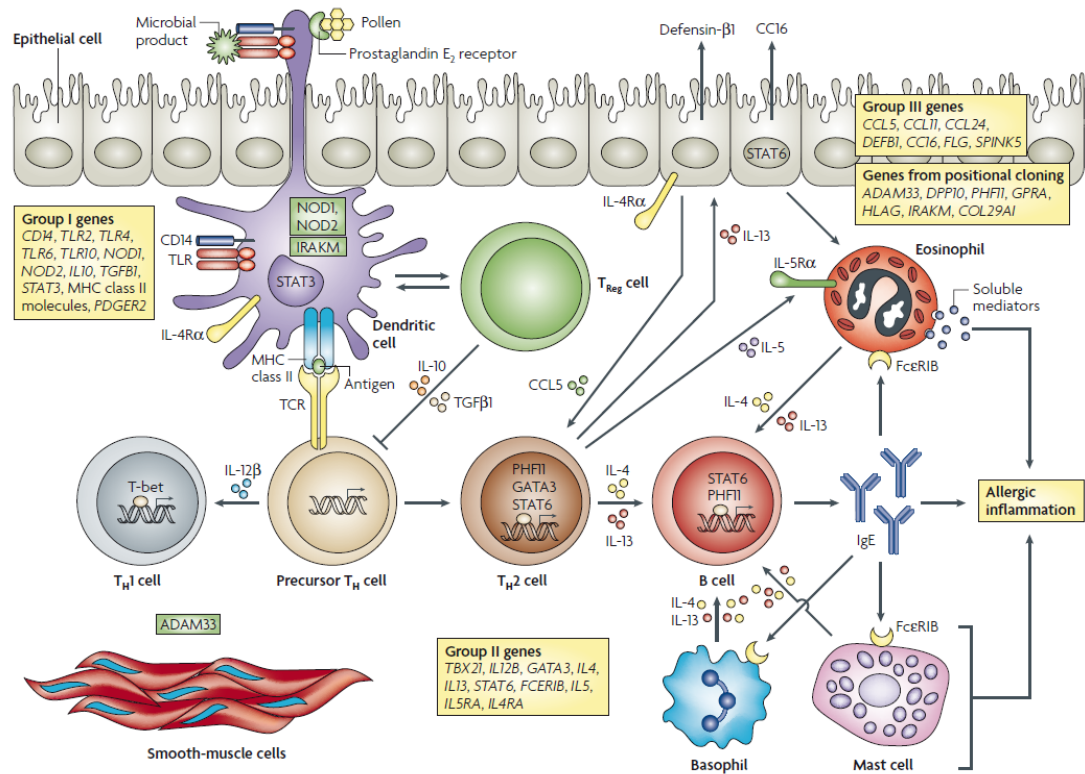
Existen en la bibliografía cientos de estudios genéticos de asma, llevados a cabo en distintas poblaciones y sobre los diferentes fenotipos que presentan los pacientes. Éstos estudios proponen la asociación con el asma de aproximadamente 100 *loci* diferentes [70]. El problema de estos estudios es la baja tasa de replicación que muestran, debido

fundamentalmente a limitaciones metodológicas y tamaños muestrales pequeños. Pero aún así, esta gran cantidad de genes descritos pone de manifiesto la gran variabilidad genética que subyace en el asma. La mayoría de las asociaciones descritas son polimorfismos concretos de genes que codifican moléculas implicadas en alguna de las rutas fisiopatológicas del asma relacionadas con la función respiratoria (hiperreactividad bronquial, parámetros de la función pulmonar), la atopia (niveles de IgE), y otros fenómenos clínicos asociados, como la dermatitis atópica, el eczema o la rinoconjuntivitis (Figura 4). Los genes relacionados con el asma pueden agruparse en cuatro categorías fundamentales, en función de los aspectos en los que intervengan: genes asociados a la respuesta inmune innata y su regulación; genes asociados con la diferenciación y funciones efectoras de los linfocitos Th2; genes asociados con la inmunidad de las mucosas; y genes asociados con la función pulmonar, la remodelación del epitelio bronquial y la gravedad de la enfermedad [63]. Debido a la enorme cantidad de genes descritos, se comentarán sólo aquellos cuya asociación se ha demostrado en al menos cinco estudios.

### **GENES QUE INTERVIENEN EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA**

La IgE desempeña un papel muy importante en la respuesta alérgica, ya que es la inmunoglobulina responsable de la amplificación de la respuesta inflamatoria. La inflamación alérgica y la regulación de IgE han sido asociadas a polimorfismos en genes que codifican *CD14* [71], receptores de tipo *Toll* (TLR) como *TLR2*, *TLR4*, *TLR6* y *TLR10* [72] y receptores intracelulares como *NOD1* (*nucleotide-binding oligomerization domain-containing 1*) y *NOD2* (*nucleotide-binding oligomerization domain-containing 2*) [73]. Están implicados en el reconocimiento de moléculas microbianas y activan los primeros mecanismos de defensa del organismo frente a ellos.

Estos polimorfismos también se encuentran asociados a otras enfermedades complejas como la enfermedad inflamatoria intestinal [74, 75] o patologías cardiovasculares [76] que, al igual que el asma, tienen un componente inflamatorio importante.



**Figura 4.** Genes que intervienen en la fisiopatología del asma [63]

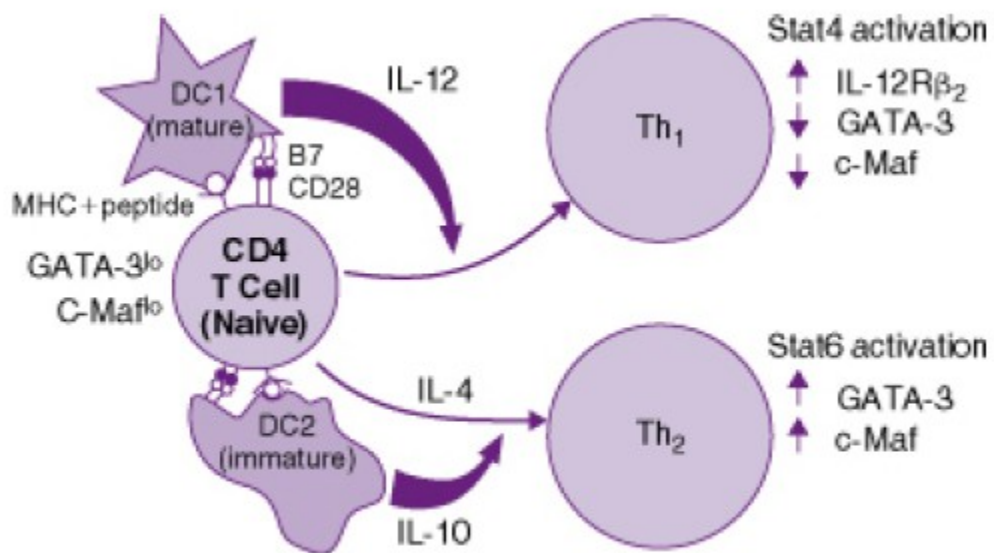
Se ha encontrado asociación entre el asma y determinadas variantes de genes de citocinas inmunorreguladoras como *IL10* o *TGFB1* (*Transforming Growth Factor-B*) [77], así como con genes de factores de transcripción como *STAT3* (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) [78]. También ha quedado de manifiesto el importante papel que juega la presentación antigénica en la respuesta alérgica dependiente de IgE, mediante estudios que muestran una asociación relevante con los alelos *DR*, *DQ* y *DP* del complejo principal de histocompatibilidad de tipo II [79].

## GENES QUE REGULAN LA RESPUESTA TH2

El segundo grupo de genes de susceptibilidad para desarrollar asma incluye genes que regulan la diferenciación de los linfocitos hacia un fenotipo Th2, un proceso clave en el desarrollo del asma y la atopia. La polarización de un linfocito CD4+ virgen (precursor de linfocitos Th1 y Th2) hacia Th2 requiere la inducción de la proteína GATA3 (*Trans-Acting T-cell-specific Transcription factor*) mediada por señales provocadas por la interacción de IL-4 y IL-4R $\alpha$  y mediadas por STAT6 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 6*) (Figura 5). La actividad de GATA3 se ve inhibida por la IL-12, citocina inductora del desarrollo de la respuesta Th1. La IL-12 estimula la producción de TGF $\beta$ 1, que a su vez establece uniones proteína-proteína que impiden la unión de GATA3 al ADN. En distintos estudios se han asociado polimorfismos en los genes *GATA3* [80], *IL4* [81], *IL4RA* [82], *STAT6* [80] e *IL-12B* [83] con el asma y la alergia, así como con la respuesta al tratamiento con corticosteroides.

La IL-13 es una de las principales citocinas efectoras en la respuesta alérgica gracias a su capacidad de inducir la síntesis de IgE. La expresión de *IL13* y de sus receptores está incrementada en el tracto respiratorio de los pacientes con asma y/o rinitis [84]. Además, IL-13 se expresa en la placenta [85] y se secreta activamente por las células T durante el período neonatal [86], un momento crítico para el desarrollo de la susceptibilidad a la enfermedad alérgica. Debido a estas características, el gen *IL13* es uno de los genes candidato más estudiados en el asma y la alergia. El polimorfismo *IL13* +2044G>A (rs 20541) provoca el cambio de la Arg de la posición 130 por Gln, dando lugar a un producto génico mutado con actividad biológica aumentada. Este polimorfismo se asocia con niveles aumentados de IgE total, y con asma, atopia y dermatitis atópica [87]. El polimorfismo -1112C>T (rs 1800925), presente en el promotor de *IL13*, se ha asociado con asma, dermatitis atópica y un aumento

del riesgo de desarrollar sensibilización alérgica, debido a que este cambio tiene como consecuencia una elevación de los niveles de transcripción de *IL13*, lo que provoca a su vez una polarización de la respuesta Th2 y estimula la síntesis de más IL-13 [88]. Es interesante señalar que estos dos polimorfismos se encuentran en desequilibrio de ligamiento, por lo tanto, es de esperar que los individuos portadores de ambos polimorfismos presenten una mayor actividad de IL-13.



**Figura 5.** Diferenciación de los linfocitos TCD4+ [35]

Los polimorfismos en la vía de transmisión de señales Th2 podrían influir también en el aumento de IgE, dependiente de citocinas expresadas por basófilos y mastocitos, mediante la activación del receptor de alta afinidad de la IgE (FcεR1). Debido a esto, determinados polimorfismos presentes en el gen que codifica la cadena β del FcεR1 (*FCER1B*) constituyen uno de los factores de susceptibilidad más replicados [89]. Estos polimorfismos podrían afectar a la expresión del receptor y la desgranulación dependientes de IgE de los mastocitos.



La fase efectora de la inflamación alérgica incluye también la activación de los eosinófilos mediada por la IL-5. La unión de la IL-5 a la cadena alfa del receptor de IL5 (IL-5RA), presente en los eosinófilos inmaduros, tiene como consecuencia la maduración de los eosinófilos, que son reclutados hacia la mucosa donde se convierten en una fuente importante de citocinas Th2. Existen estudios que asocian polimorfismos en los genes *IL5* e *IL5RA* con el asma y sus síntomas [90], pero no de forma tan clara como sucede con otros genes característicos de la respuesta Th2.

### **GENES ASOCIADOS A LA INMUNIDAD DE LAS MUCOSAS**

El tercer grupo de genes de susceptibilidad para desarrollar asma o alergia se expresan en las células epiteliales. El epitelio secreta quimiocinas, como CCL5 (RANTES), que atrae a células T y eosinófilos, y CCL11, CCL24 y CCL26 (eotaxinas 1 a 3), que actúan como poderosos quimioatrayentes de eosinófilos. El epitelio también secreta péptidos antimicrobianos (como la defensina  $\beta$ 1) y CC16, que inhiben la diferenciación hacia Th2 actuando sobre células presentadoras de antígenos [91]. Los genes que codifican estas proteínas son buenos candidatos para estudiar su asociación con el asma [92-94]. La proteína SPINK5 (*Serine Protease Inhibitor Kazal-type 5*) actúa como molécula protectora frente a las proteasas liberadas por los mastocitos o el efecto de los alérgenos, y solo se expresa en el epitelio. Una mutación no sinónima en este gen, (*SPINK5* Glu420Lys, rs 230307) presenta una notable asociación con el asma y el eczema [95].

Mención aparte merece el gen de la filagrina (*FLG*). Se trata de una proteína expresada en la epidermis y en las mucosas oral y nasal [96] que forma parte del complejo de diferenciación epidérmico en el cromosoma 1q21 y que ha sido asociada a dermatitis atópica y eczema [97].

Algunos estudios relacionan también determinadas variantes del gen de la filagrina con la gravedad del asma asociada a dermatitis atópica [98].

### **GENES INVOLUCRADOS EN LA FUNCIÓN PULMONAR**

El último grupo de genes candidatos es más heterogéneo y comprende genes asociados a la función pulmonar, la remodelación bronquial y la gravedad de la patología. Este grupo incluye principalmente el gen *ADRB2* [99] y el *TNF* [100], así como otros genes también asociados al asma como el de la sintasa del leucotrieno C4 (*LTC4S*) [101], Glutation-S-Transferasas (*GSTP1* y *GSTM1*)[102], receptor A2 de tromboxanos (*TBXA2R*) [103], araquidónico-5-lipooxigenasa (*ALOX5*) [104], linfotoxina  $\alpha$  (*LT-A*) [100], tenascina-C (TNC) [105] y sintasa de óxido nítrico (*NOS*) [106]. Algunos de estos genes, como *LTC4S*, *ALOX5*, *ADRB2*, intervienen en la respuesta a determinados tratamientos, por lo que están siendo investigados en estudios farmacogenéticos [107].

### **GENES IDENTIFICADOS POR CLONACIÓN POSICIONAL**

Este tipo de genes merecen un apartado individual, ya que se trata de *loci* que antes de ser identificados en estudios de ligamiento no se pensaba que ejercieran influencia sobre el asma, por lo que han supuesto el descubrimiento de nuevas rutas patogénicas en el asma.

Uno de los genes detectados por éste método es la metaloproteasa *ADAM33* (*Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 33*), implicada en la remodelación bronquial característica del asma. Este gen fue identificado en un estudio de ligamiento llevado a cabo con 460 familias de Reino Unido y Estados Unidos [108]. En este estudio se identificó una región en el brazo corto del cromosoma 20 con ligamiento significativo con el asma y la hiperreactividad bronquial. Tras un análisis posicional de la región se identificó a *ADAM33*

como la fuente de la señal de ligamiento. La asociación de *ADAM33* con el asma y la función pulmonar ha sido confirmada en distintas poblaciones [109] y ha supuesto un hallazgo importante, ya que pone de manifiesto el importante papel que juega la remodelación bronquial en la patología del asma.

*PHF11 (Plant Homeodomain Finger protein 11)* es un gen presente en la región 13q14 que codifica una proteína de la familia PHD (*plant homeodomain*), caracterizada por presentar en su estructura uno o más dedos de zinc. Esta proteína ejerce su función en el núcleo, interaccionando con las histonas y modificando la transcripción génica [110]. Este gen se identificó mediante un estudio de ligamiento en el que se asoció su posición a niveles elevados de IgE. Se han asociado variantes en este gen con la gravedad del asma [111].

En 2003 Allen y col. demostraron que la región 2q14-32 se encuentra ligada al asma y a la hiperreactividad bronquial. Un estudio de dicha región mostró que la asociación se limitaba a los 3,6 Kb iniciales del gen *DPP10*, que codifica la dipeptidil-dipeptidasa 10, involucrada en la escisión de péptidos terminales de citocinas y quimiocinas [112].

Otros genes descritos mediante clonación posicional son: *GPRA* (Receptor de proteína G asociado al asma), situado en el cromosoma 7p y asociado al asma y la atopia [113]; *CYFIP2* (proteína que interacciona con la FMR (*Cytoplasmic fragile X mental retardation protein*)), en la región 5q33 y que presenta seis SNP asociados al desarrollo de asma (su expresión se encuentra incrementada en linfocitos de pacientes homocigotos para un determinado haplotipo) [114]; *IRAKM* (kinasa-M asociada al receptor de IL-1), en la región 12q13-34, que es un inhibidor del receptor de la IL-1 que se ha asociado a la aparición de asma en varias poblaciones. Se han detectado polimorfismos de *IRAKM* asociados una mayor expresión en células epiteliales de biopsias pulmonares en pacientes asmáticos [115].

## LOS GWA Y EL ASMA

En el año 2007 se publica el primer estudio de asociación del genoma completo relacionado con el asma [116]. En este artículo, Moffat y cols. estudiaron más de 317.000 SNP en 994 niños asmáticos y 1243 controles y encuentran una asociación importante con la región 17q21.1. Un estudio más exhaustivo de esta región de 206 Kb, en la que se encuentran genes como *STAT3*, *CRHR1* (*Corticotropin releasing hormone receptor 1*), *ITGB3* (*Integrin beta-3*) y *TBX21*, refleja una asociación consistente con los niveles de expresión de *ORMDL3* (proteína 3 de tipo Orosomucoide 1). Este gen sintetiza una proteína de función desconocida, que se expresa en prácticamente todos los tejidos como una proteína transmembranaria anclada al retículo endoplásmico [117].

En 2008 se publicó un estudio tipo GWA en el que se relacionan dos variantes del receptor de alta afinidad de la IgE (*FCER1A*) ubicados en el cromosoma 1q23, con los niveles de IgE [118].

Otro estudio más reciente [119], realizado en Japón, con 280 asmáticos frente a 1032 controles, en el que se genotiparon 82.935 SNP y sólo se encontró asociación significativa en las primeras etapas del estudio (no consigue replicar significativamente sus resultados) con los genes *PEX19* (*Peroxisomal biogenesis factor 19*) (rs2820421), *HPCAL1* (*Hippocalcin-like protein 1*) (rs3771140), *IL18R1* (rs3213733); ninguno de los tres había sido previamente asociado con el asma.

Se trata de estudios muy interesantes que prometen permitir avanzar enormemente en el conocimiento de las causas genéticas de la patología, pero hasta el momento los resultados que han ido arrojando no son tan determinantes como se pensaba. Para mejorar su capacidad

de detección de variantes habría que mejorar las herramientas estadísticas que determinen la asociación, tener en cuenta interacciones génicas, etc.

## **EPIGENÉTICA Y ASMA**

Hasta ahora hemos descrito la genética del asma como cambios en las bases del ADN que provocan la aparición de variantes que pueden tener influencia sobre el riesgo de desarrollar la patología. En las últimas décadas ha tenido lugar un incremento constante tanto en la frecuencia como en la gravedad de las enfermedades atópicas, principalmente en los países occidentalizados [120]. Este incremento en las enfermedades atópicas se ha producido en un período tan corto que parece poco probable que se deba únicamente a factores genéticos, necesitados de bastante más tiempo para asentarse en las poblaciones [121]. En este sentido, en la última década se ha desarrollado el área de la epigenética, que engloba los cambios en un organismo a causa de alteraciones en la expresión de la información genética sin modificación de los genes. Las modificaciones epigenéticas incluyen gran cantidad de modificaciones relacionadas con la metilación del ADN, modificación de histonas, y otros mecanismos.

La epigenética tiene gran relevancia en el estudio de patologías tan complejas como el asma, con un componente genético enormemente variable, e influidas en gran medida por factores ambientales. En este sentido, futuras investigaciones de las características epigenéticas del asma como enfermedad compleja aportarán una información muy valiosa en el estudio de esta patología.

## FARMACOGENÓMICA EN EL ASMA

Es frecuente en la práctica diaria que pacientes con características clínicas similares respondan de forma diferente a un mismo tratamiento. La farmacogenómica es la disciplina que estudia el efecto de la variabilidad genética de un individuo en su respuesta a determinados fármacos. Estas diferencias podrían deberse a factores ambientales o al cumplimiento del tratamiento. El avance del conocimiento del genoma ha llevado a pensar que una posible causa de dicha variabilidad podría deberse a factores genéticos. La farmacogenómica es la disciplina que estudia cómo determinados factores genéticos afectan a la respuesta ante un determinado tratamiento [107]. Se trata de una disciplina de aparición reciente que permite diseñar tratamientos individualizados en función de las características genéticas de los pacientes [122].

En el caso concreto del asma, hay varias estrategias farmacoterapéuticas actualmente en uso [1] entre ellas  **$\beta$ 2-agonistas** inhalados para disminuir la obstrucción de las vías respiratorias (albuterol, salmeterol y formoterol, entre otros); **Glucocorticosteroides** de uso sistémico o inhalado (beclometasona, budesonida, fluticasona, y prednisona, por citar algunos compuestos); **Teofilina** y sus derivados, usados tanto para el control del broncoespasmo y de la inflamación; Inhibidores y receptores agonistas de la vía de los **leucotrienos cisteinílicos** (molekulast, pranlukast, zafirlukast y zileuton).

Hasta la fecha, los investigadores en el campo de la farmacogenómica en el asma han centrado principalmente sus esfuerzos en tres clases de terapia:

- **$\beta$ 2-Agonistas**: ejercen su función estimulando el receptor  $\beta$ 2 adrenérgico del músculo liso bronquial (gen *ADRB2*), facilitando una broncodilatación rápida. La respuesta a este tipo de fármacos es la ruta farmacológica más investigada en el asma. El gen *ADRB2* se encuentra

en la región cromosómica 5q32 y ha sido ampliamente estudiado en individuos con asma [123], debido a su ligamiento significativo a la enfermedad [124]. Estudios in vitro han demostrado que la presencia de un polimorfismo en la posición 16 de la proteína ADRB2 provoca el cambio de aminoácido en dicha posición de Glicina a Arginina [125], lo que tiene como consecuencia variaciones en la acción de los medicamentos  $\beta$ -2 agonistas. .

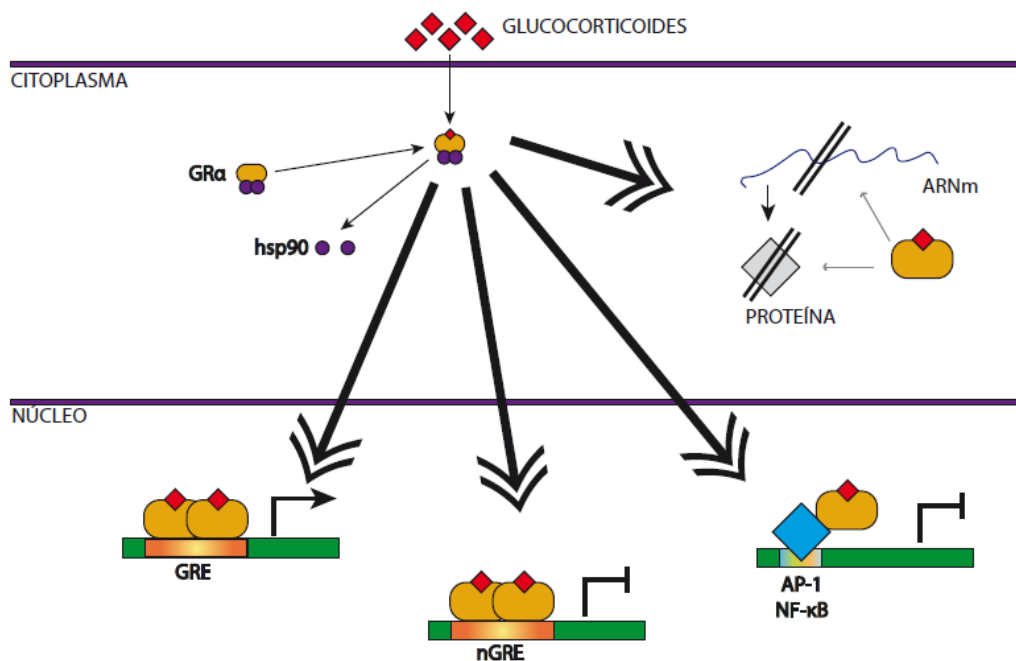
- Antagonistas de Leucotrienos: los leucotrienos son moléculas derivadas del ácido araquidónico, liberados por los eosinófilos, mastocitos y macrófagos alveolares durante la respuesta inmune, y que actúan como uno de los principales mediadores de la respuesta inflamatoria en el asma. En su biosíntesis intervienen fundamentalmente tres enzimas: la 5-lipooxigenasa (ALOX5), la sintasa de LTC4 (LTC4S) y la LTA4 epoxi-hidrolasa (LTA4H). De éstas tres enzimas, se ha propuesto un papel determinante en la respuesta a fármacos de la ALOX5 y la LTC4S [126].

ALOX5 es la lipooxigenasa encargada de la síntesis de leucotrienos. Su actividad determina los niveles de leucotrienos broncoconstrictores presentes en la vía aérea, por lo que la inhibición farmacológica de esta enzima tiene como consecuencia una mejora de los síntomas. Se ha propuesto que un polimorfismo de tipo VNTR presente en el promotor del gen que codifica para esta enzima podría estar asociado con una menor actividad de la enzima, y por tanto, su presencia tendría como consecuencia una baja respuesta a medicamentos agonistas de los leucotrienos [127]

La sintasa de LTC4 es una enzima de membrana cuya función principal es convertir LTA4 en LTC4. El gen presenta un polimorfismo en su región promotora (-444A>C) y se han descrito estudios de asociación con el asma [101] y con la intolerancia a la aspirina [128]. Se ha demostrado que la presencia en homocigosis de este polimorfismo en individuos

asmáticos tiene como consecuencia una peor respuesta al zafirlukast (antagonista del receptor de tipo 1 de los leucotrienos cisteinílicos) [129].

- Corticosteroides: los corticosteroides inhalados son actualmente los medicamentos más eficaces en el tratamiento del asma [1]. Ejercen su función (figura 6) modificando la transcripción de genes, de manera que por un lado inhiben la transcripción de genes de proteínas pro-inflamatorias y por otro activan la transcripción de genes que intervienen en la respuesta anti-inflamatoria [130].



**Figura 6.** Mecanismos intracelulares inducidos por los glucocorticoides.

El gen que codifica el receptor de corticotropina (*CRHR1*), además de jugar un papel fundamental en la biología de los esteroides, también se ha relacionado con la farmacogenética en el asma. Se ha demostrado que la presencia del haplotipo GAT formado por los polimorfismos rs1876828, rs242939 y rs242941 confiere a los pacientes la capacidad de responder mejor al tratamiento con corticosteroides [131].



Las asociaciones génicas con la respuesta al tratamiento constituyen un avance muy importante en el desarrollo de la terapia individualizada. Es muy probable que en un futuro próximo se lleven a cabo más estudios genéticos de respuesta a tratamiento para el asma y otras enfermedades inflamatorias que determinen patrones genéticos indicativos de la terapia que debe recibir un paciente para maximizar los efectos beneficiosos y disminuir, en la medida de lo posible, los efectos adversos.

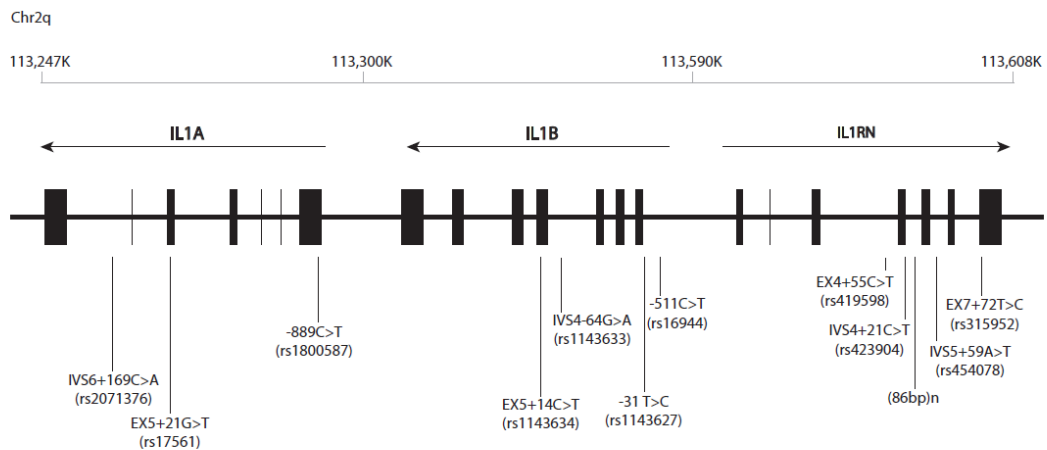
## **1.6 CITOCINAS y SUS RECEPTORES**

### **IL-1**

La IL-1 es una citocina proinflamatoria que presenta dos formas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , codificadas por genes distintos, cuyas actividades biológicas son prácticamente indistinguibles. Se localizan en el brazo largo del cromosoma 2, formando un complejo génico con otros genes de la familia de IL-1 (Figura 7).

Ambos genes *IL1A* e *IL1B* presentan 6 exones con una estructura similar, lo que sugiere un evento de duplicación génica hace 350 millones de años [132].

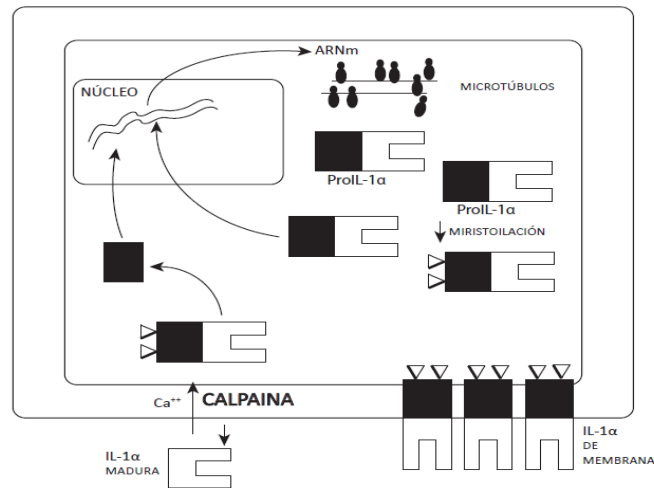
Tanto la IL-1 $\alpha$  como la IL-1 $\beta$  son sintetizadas en forma de propéptidos de 31 KDa que presentan una homología del 20% en sus secuencias [133]. Ambos deben sufrir un procesamiento proteolítico para pasar a su forma activa y ejercer los efectos biológicos en el exterior celular (Figuras 8 y 9). Carecen de dominio hidrofóbico, por lo que no son excretados al exterior celular mediante vesículas formadas en el retículo endoplásmico [133]; se traducen en ribosomas asociados a microtúbulos que posteriormente son procesadas para convertirse a su forma activa. El procesamiento es diferente en función de si la IL-1 es  $\alpha$  (Figura 8) o  $\beta$  (Figura 9) [134].



**Figura 7.** Estructura del complejo genético de la IL1 [135]

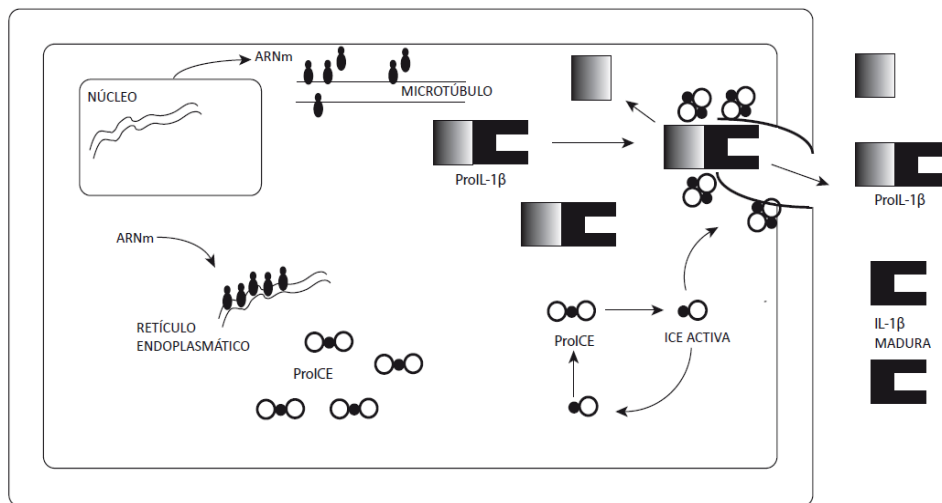
IL-1 es una citocina producida fundamentalmente por células de la línea fagocítica mononuclear, aunque también la producen células endoteliales, queratinocitos, células sinoviales, astrocitos, osteoblastos, neutrófilos, células de la glía y otras células involucradas en la inflamación. Su producción puede verse estimulada por gran variedad de agentes, como la endotoxina, otras citocinas, microorganismos y otros antígenos. Esta citocina es liberada al medio extracelular cuando la célula sufre apoptosis.

La IL-1 cumple un papel muy importante en la presentación de antígeno, contribuyendo a la activación y proliferación de las células T. Incrementa la producción de moléculas derivadas de los linfocitos T, como la IL-2 y los receptores de IL-2. Además de estos efectos sobre los linfocitos T, la IL-1 puede aumentar la proliferación de los linfocitos B e incrementar la síntesis de inmunoglobulinas.



**Figura 8.** Procesamiento del ARNm de *IL1A*: El precursor de IL-1α (pro IL-1α) es sintetizado en ribosomas asociados a microtúbulos y permanece en el citosol, donde sufre miristoilación. Esta modificación permite que pueda anclarse a la membrana plasmática o que pueda ser procesada por una cisteín-proteasa (calpaína) dependiente de calcio que libera al citoplasma la forma activa de 16kDa. Una vez activas son liberadas al exterior celular por la rotura de la membrana plasmática de la célula.

La IL-1 ejerce numerosos efectos sobre el sistema nervioso, hígado, músculo, articulaciones, hueso, durante la inflamación. La IL-1 estimula también la adherencia de los leucocitos al endotelio mediante el aumento de expresión de ICAM-1, VCAM-1 y Selectina E. A nivel de los vasos sanguíneos induce vasodilatación, contribuyendo a la hipotensión en el choque séptico. Muchas de las actividades proinflamatorias de la IL-1 están relacionadas con su capacidad de inducir la ciclooxigenasa-2 (COX-2) con incremento de productos eicosanoides, incluyendo prostaglandina E2 (PGE2) y leucotrieno B4 (LTB4) como segundos mensajeros. La IL-1 induce la síntesis de otras citocinas como TNF, IL-6, GM-CSF y, mediante retroalimentación positiva, un incremento en la síntesis de IL-1. Al igual que el TNF, la IL-1 tiene efectos citotóxicos sobre las células cancerosas e infectadas por virus. El TNF y la IL-1 comparten numerosas actividades biológicas; la principal diferencia es que TNF no tiene efecto directo sobre la proliferación linfocitaria.



**Figura 9.** Procesamiento del ARNm de *IL1B*: Una vez sintetizado del precursor de IL-1β (pro IL-1β) permanece en el citosol, donde también puede ser miristoilado (a diferencia de IL-1α, IL-1β no presenta formas en la membrana). La pro IL-1β pasa a su forma activa gracias a la acción de la enzima convertidora de IL-1 (ICE), un heterodímero localizado en la cara interna de la membrana plasmática. La liberación de la forma activa de 17 KDa, se realiza principalmente mediante la lisis de la membrana plasmática, aunque se ha observado que puede haber liberación sin pérdida de integridad de la membrana de la célula, por lo que existiría algún canal que permite su secreción. Al producirse la rotura de la célula, también salen al exterior propéptidos que pueden pasar a la forma activa gracias a otras enzimas presentes en el ambiente extracelular, como la elastasa, tripsina o quimiotripsina [134].

Se han descrito numerosos polimorfismos en ambos genes, asociados a diferentes enfermedades con un notable componente inflamatorio. Kornman y col. [136] estudiaron la relación de los polimorfismos *IL1A* -889 T>C y *IL1B* 3953 T>C con la gravedad de periodontitis en pacientes fumadores y encontraron que la presencia de ambas mutaciones supone un mayor riesgo. Diversos estudios han demostrado la asociación del polimorfismo *IL1A* -889 T>C con la enfermedad de Alzheimer, confirmando el importante papel de la inflamación en la patología de esta enfermedad [137, 138]. Se ha encontrado una asociación significativa entre

los polimorfismos *IL1A* 4845 C>T y *IL1B* -511 C>T y la presencia de poliposis nasal, tanto en presencia [139] como en ausencia de asma [140].

## **IL-1RN**

El antagonista del receptor de la IL- 1 es una proteína de la familia de la IL 1, cuya función principal es inhibir la actividad de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , y de ese modo modular la gran variedad de respuestas inmunológicas mediadas por estas interleucinas.

El gen se ubica en el complejo génico del cromosoma 2, contiguo a los genes que codifican la IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ . Contiene 8 exones que ocupan 22,9 Kb. Presenta cuatro isoformas diferentes, en función del ajuste que sufra el ARNm.

La proteína completa consta de 177 aminoácidos y tiene una masa molecular de 20KDa. Su secuencia aminoacídica presenta una homología del 26% con la de la IL-1 $\beta$  superior a la que presentan IL-1 $\alpha$  y IL-1 $\beta$  entre sí [134]. La forma activa es secretada al exterior celular a través del aparato de Golgi y el retículo endoplasmático (RE) [132] por monocitos, macrófagos, neutrófilos y fibroblastos en respuesta a estímulos inflamatorios como el lipopolisacárido bacteriano u otras citocinas [141]. Ejerce su función como antagonista de la IL-1 uniéndose al IL-1R e impidiendo la unión de éste a IL-1 $\alpha$  y IL-1 $\beta$ . A pesar de la homología de su secuencia con la de la IL-1 $\beta$ , no funciona como agonista debido a que su unión al receptor tiene como consecuencia el bloqueo del sitio de unión a la proteína accesoria del receptor de IL-1 (IL-1RAP) [132], lo que impide la activación del dominio TIR intracitoplasmático.

Se han asociados determinados polimorfismos en el gen *IL1RA* con enfermedades inflamatorias como la Diabetes de tipo I [142]. También se ha descrito su asociación con la presencia y gravedad del asma, tanto en niños [143, 144] como en adultos [145]. En cuanto al

polimorfismo IL1RA 11100MspI T>C (rs315952), ha sido asociado con la gravedad del Lupus Eritematoso Sistémico [146], y se ha descrito un efecto protector del alelo normal en el mieloma múltiple [147].

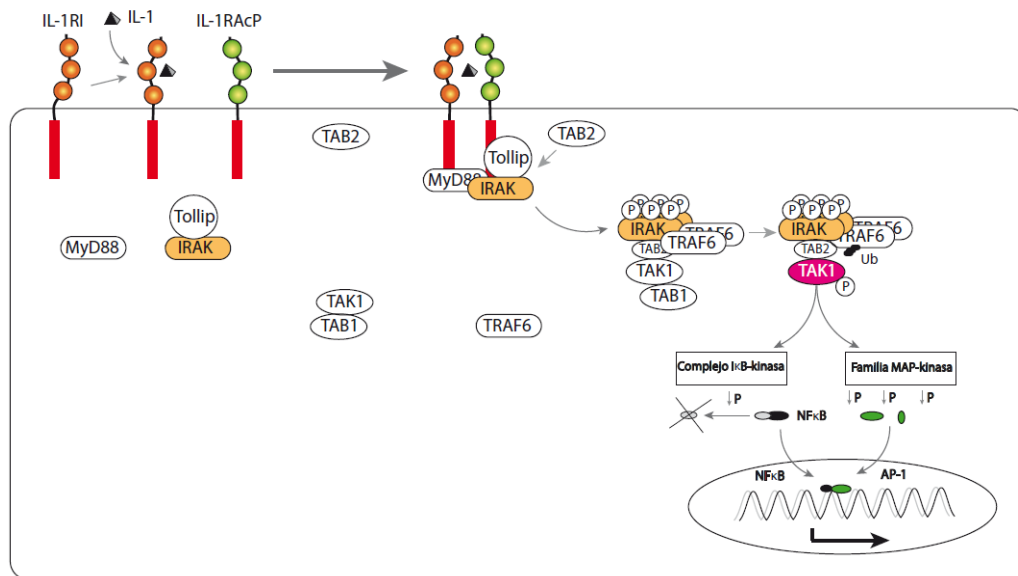
## **IL-1R1**

El receptor de IL-1 de tipo I (IL-1RI) es una proteína que actúa como receptor de la IL-1A, la IL-1B y del IL-1RA. Se trata de un importante mediador involucrado en la mayoría de las respuestas inmunes e inflamatorias mediadas por éstas citocinas.

El gen que codifica el IL-1R se encuentra en el brazo largo del cromosoma 2, muy próximo al centrómero (2q12). Forma parte del complejo génico de la familia de genes del tipo del receptor de IL-1 (*interleukin-1 receptor-like genes*), que incluye, además del gen que codifica el IL-1R, los genes que codifican el receptor de IL-1 de tipo II (IL-1R2), la proteína asociada al receptor de IL-1 (IL-1RL1), IL-18R1 (componente del receptor de IL-18) e IL-1RL2, cuya función no ha sido definida [148]. Es un gen de 26 Kb que contiene doce exones y codifica 16 ARNm diferentes debido a la presencia de promotores y sitios de ajuste alternativos. Algunos de estos productos alternos codifican proteínas no funcionales y otros, receptores incompletos.

La proteína que da lugar a un IL-1R activo tiene un tamaño de 569 aminoácidos y una masa molecular de 65 KDa. Presenta una región extracelular con tres dominios de tipo Inmunoglobulina mediante los cuales se une a la IL-1, una región transmembranaria y un dominio citoplasmático homólogo a los receptores de tipo *Toll* (dominio TIR), moléculas implicadas en la inmunidad innata y la inflamación y muy conservadas a lo largo de la evolución.

La activación de IL-1R descrita en la figura 10 desencadena los efectos de IL-1, destacando la liberación de numerosas citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-2 e IL-1.

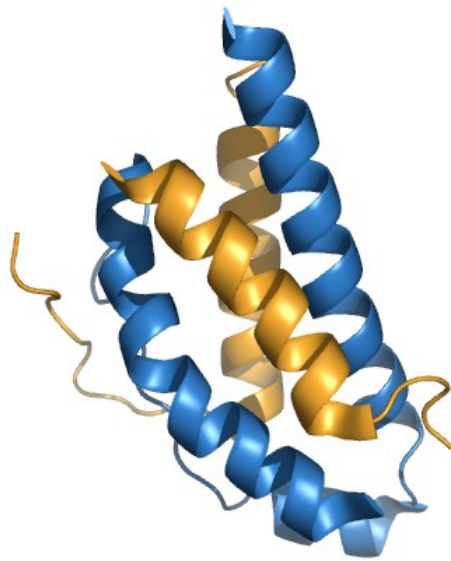


**Figura 10.** Acción de IL 1. La unión de la IL-1 $\alpha$  a la región extracelular del receptor, y la unión de ambos a la proteína accesoria del receptor de IL-1 (IL-1RAP) desencadenan la activación del dominio TIR. Esto provoca la activación del factor de transcripción nuclear KB (NF-KB), que induce la transcripción de genes que codifican proteínas importantes en la respuesta inmune innata [149].

No se encuentran muchos estudios que describan asociaciones de variantes alélicas de este gen con enfermedades. Cabe destacar algunos estudios que intentan relacionar el polimorfismo IL-1R rs2234650 con diversas enfermedades inflamatorias. Este polimorfismo ha sido estudiado en pacientes con oftalmopatía de Graves [150], inmunodeficiencia variable común (CVI) [151], vasculitis [152] y asma [153], sin que se haya encontrado asociación significativa. Sin embargo se ha encontrado una asociación significativa de este polimorfismo con la gravedad de la Esclerosis Múltiple [154] y la Diabetes del tipo I [155].

## IL-2

La IL-2 es una citocina cuya principal función es estimular el crecimiento y proliferación de los linfocitos T y otras células inmunitarias, además de inducir la síntesis de otras citocinas y moléculas pro-inflamatorias.



**Figura 11.** Estructura cristalográfica de la IL-2 [156]

Está codificada por un gen presente en la región cromosómica 4q27, donde ocupa aproximadamente 4kb. Consta de cuatro exones que codifican dos transcritos conocidos, uno de los cuales no se traduce.

La forma activa consta de 133 aminoácidos (17,6 KDa de masa molecular). Es una proteína con estructura globular (Figura 11.) que contiene cuatro hélices alfa [157]. Es secretada al exterior de la célula, donde cumple sus funciones gracias a la unión con su receptor (IL-2R), que es una proteína heterotrimérica cuya región gamma es común a otros receptores de



interleucinas, como el IL-4R o el IL-7R. La expresión de *IL2* se produce durante la respuesta inmunitaria debido a la unión de los antígenos a los receptores de los linfocitos T [158]. Su interacción con la IL-2R estimula el crecimiento, diferenciación y supervivencia de los linfocitos T citotóxicos mediante la activación de genes específicos [159, 160]. Además actúa como factor de diferenciación en los linfocitos NK y estimula la producción de inmunoglobulinas [161]. La IL-2 también interviene en el desarrollo de las células T en el timo, desempeñando un papel fundamental en la maduración de los linfocitos T reguladores [162].

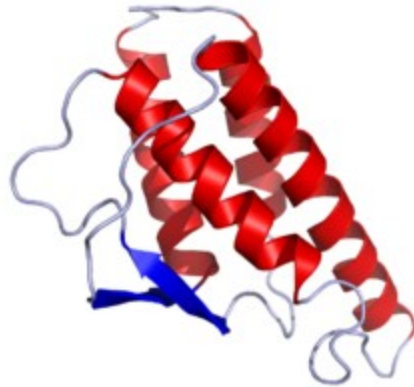
Debido al papel clave de esta citocina en la respuesta inmune, existen numerosos estudios que asocian alguna de sus características con patologías de origen autoinmune. Cabe destacar las asociaciones de algunas variantes génicas con enfermedades de tipo inflamatorio como la artritis reumatoide [163] o la enfermedad inflamatoria intestinal [164].

Se han descrito dos polimorfismos en el gen *IL2*. El primero de ellos se encuentra en el promotor, en posición -330 (rs2069762). Se ha propuesto que la presencia de éste polimorfismo en homocigosis provoca un incremento en la expresión de IL2 [165]. Existen datos de que este polimorfismo se asocia con la presencia de asma, alergia, y dermatitis atópica [166]. El segundo polimorfismo descrito se encuentra en la región codificante, en posición +166 (rs2069763) y provoca una mutación sinónima.

## **IL-4**

La IL-4 es, junto con la IL-13, la principal citocina responsable de la respuesta IgE. Esto se debe a que es el principal estímulo para la síntesis de anticuerpos anti-IgE, además de inducir la respuesta Th2.

El gen que codifica la IL-4 se encuentra en la región cromosómica 5q31.1 donde también se encuentran otros genes que codifican otras citocinas fundamentales en el desarrollo del asma y la atopía [167] como la IL-3, IL-5, IL-9, IL-12B, IL-13 o el GM-CSF. Es un gen que ocupa aproximadamente 9kb y está compuesto de cuatro exones y tres intrones. Puede sufrir ajuste alternativo, dando lugar a una proteína que carece de los residuos del 46 al 61 [168].



**Figura 12.** Estructura cristalográfica de la IL4 [169]

La proteína completa tiene una masa molecular de 17,5 KDa, y consta de 153 aminoácidos (Figura 12). Es secretada al exterior celular, donde cumple su función. Se trata de una proteína sintetizada principalmente por los linfocitos T CD4+, eosinófilos y mastocitos presentes en las vías respiratorias de individuos alérgicos [170, 171]. La IL-4 desempeña un papel crítico en el desarrollo de las células Th2 [172]. Por un lado, inhibe la expresión de la subunidad  $\beta 2$  del receptor de la IL-12 en las células T, lo que provoca la inhibición en la producción de células Th1. Por otro lado, la IL-4 induce la producción y secreción de citocinas de tipo Th2 y de NO y la secreción de otras citocinas pro-alérgicas. La IL-4 resulta crítica en el cambio de isotipo de las células B hacia la producción de IgE, aunque este efecto puede verse incrementado por otras citocinas como la IL-5, la IL-10 y el  $\text{TNF}\alpha$  [173]. Una vez que ha tenido lugar el cambio de isotipo, la IL-4 potencia la producción de IgE, además de producir una sobreexpresión de

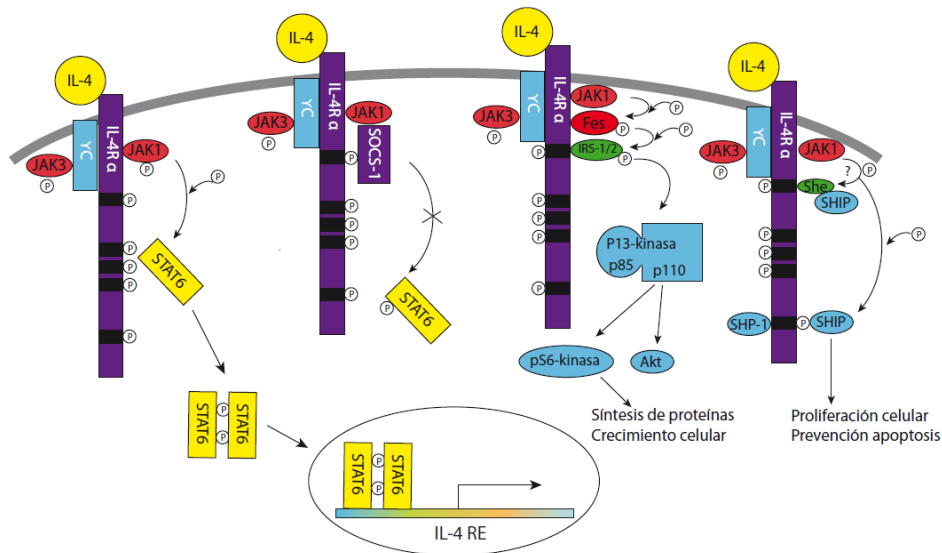
receptores para IgE en los mastocitos de las vías respiratorias. La IL-4 también promueve la metaplasia de las células caliciformes, la hipersecreción de moco y el aumento de la expresión de VCAM-1 en las células endoteliales, lo que tiene como consecuencia un mayor reclutamiento de eosinófilos.

Como se ha descrito anteriormente, la IL-4 desempeña un papel fundamental en la respuesta alérgica, por lo que se trata de un buen gen candidato a ser estudiado. De hecho, es uno de los genes relacionados con el asma y la atopia que más se ha estudiado [63]. Existen pruebas de que los polimorfismos -33C>T (rs 2070874) y -590 C>T (rs 2243250) se asocian con los niveles totales de IgE, el asma y otros fenotipos alérgicos en diferentes poblaciones [81, 174-176]. El polimorfismo -1098 T>G (rs 2243248) se ha asociado con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, con la que también ha sido asociado un haplotipo formado por los tres polimorfismos [177].

### **IL-4R $\alpha$**

La IL-4 ejerce su acción mediante la unión a su receptor (IL-4R), presente en la membrana plasmática de los linfocitos T activados. Consta de dos subunidades, la cadena  $\alpha$  (IL-4R  $\alpha$ ) y la cadena  $\gamma$  [178]. Los receptores de IL4 e IL13 comparten la misma cadena alfa, lo que justificaría la similitud de sus papeles biológicos [179].

El gen que codifica la *IL4R $\alpha$*  se ubica en la región cromosómica 16p12, que se ha ligado con el asma en distintas poblaciones [174, 180]. Ocupa una región de 50 Kb y tiene 12 exones. La forma más común es una proteína de membrana de 89,6 KDa y 825 aminoácidos. Presenta un dominio intracelular de unión a la IL-4, un dominio transmembranario y un dominio intracelular que desencadena la cascada de transmisión de señales (Figura 13).



**Figura 13.** Mecanismos moleculares de la unión IL4-IL4R [181]: La unión de IL-4 a IL-4R $\alpha$  tiene como consecuencia la activación de STAT6, factor de transcripción que induce la síntesis de mediadores de la respuesta alérgica.

Se han descrito varios polimorfismos en la región codificante del gen *IL4RA*, muchos de ellos causantes de sustituciones de aminoácidos [182]. En la posición 1092 se encuentra un polimorfismo que consiste en un cambio de A por G (rs1801275), lo que provoca el cambio del aminoácido 576 de glutamina a arginina (Q576R). Éste cambio se ha asociado a una mayor respuesta a la IL-4 en pacientes atópicos [183], así como la presencia de asma atópica en sujetos de raza blanca[180].

## IL-6

La interleucina 6 (IL-6) es un importante mediador de la respuesta de fase aguda y la inflamación crónica, y ejerce efectos pro- y anti-inflamatorios gracias a la unión con su receptor (IL-6R $\alpha$ ) [184].

El gen que codifica la IL-6 se localiza en el brazo corto del cromosoma 7 (7p21), ocupando aproximadamente 6 Kb. Tiene cinco exones y cuatro intrones [185]. La IL-6 es una proteína de

212 aminoácidos que ejerce su función en forma de homodímero en el que cada subunidad forma un dominio globular de cuatro hélices alfa (Figura 14). El receptor de la IL-6 consta de una proteína que se une a la citocina y una subunidad transdutora de señales de 130 KDa (gp130), que activa la vía de transmisión de señales de señales JAK/STAT y también forma parte de las vías de transmisión de señales de otras citocinas [186].

Esta proteína es sintetizada fundamentalmente por los macrófagos [187], aunque también es producida por los linfocitos T y B, fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, hepatocitos, células de la glía y otras células de la médula ósea. Su síntesis se ve estimulada por la IL-1, IL-2, el TNF y el IFN; sin embargo, se ve inhibida por citocinas pro-Th2 como la IL-4 e IL-13. En la inmunidad adaptativa, la IL-6 estimula el crecimiento de los linfocitos B productores de anticuerpos; gracias a la influencia de esta citocina, los linfocitos B maduran a células plasmáticas y secretan inmunoglobulinas. La IL-6 también media la activación, crecimiento y diferenciación de los linfocitos T. Esta citocina es fundamental en la síntesis hepática de proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva, el fibrinógeno y la haptoglobina, entre otras. También presenta actividad antiviral ya que comparte con el IFN su capacidad de inducir la expresión del complejo de histocompatibilidad de tipo I.



**Figura 14.** Interacción del homodímero de IL-6 con la gp130 [188]

En contraste a estos efectos proinflamatorios descritos, la IL-6 actúa como mediador de varios efectos antiinflamatorios. Tiene la capacidad de detener la cascada inflamatoria mediante la inhibición de la síntesis de la IL-1, y del TNF, así como de su propia síntesis. Además estimula la síntesis del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA) [189].

Existen estudios que proponen que determinados polimorfismos presentes en la región promotora del gen de IL-6 influyen en los niveles de expresión de la citocina [190], con el consecuente efecto sobre las respuestas inmunológicas mediadas por ésta. Éstos polimorfismos se encuentran en las posiciones -174G>C (rs1800795) y -597 G>A (rs 1800797), y se han asociado a la artritis crónica juvenil [190], al sarcoma de Kaposi en pacientes con VIH [191], al hiperandrogenismo [192] y a la diabetes de tipo I [193], entre otras. El polimorfismo en posición -174 ha sido asociado a la presencia de asma infantil [143].

## IL-10

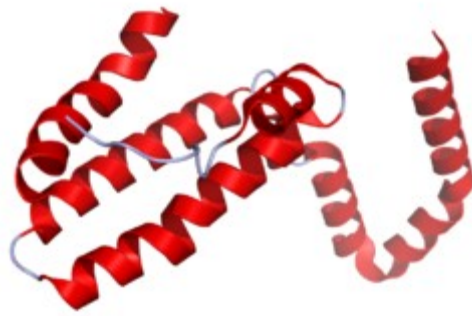
La interleucina 10 (IL-10) también conocida como factor inhibidor de la síntesis de citocinas (CSIF) es una citocina anti-inflamatoria que es codificada por el gen *IL10* [194] y sintetizada principalmente por monocitos.

El gen *IL10*, localizado en el cromosoma 1q31-q32, ocupa aproximadamente 4,89 Kb de ADN genómico. Contiene 5 exones y 4 sitios consenso GT-AG que pueden generar tres ARNm diferentes. Sólo uno de los tres tipos de ajustes posibles codifica una proteína funcional. Se trata de una proteína homodimérica de 20,6kDa y 178 aminoácidos [195] (Figura 15). Es sintetizada por varios tipos celulares (linfocitos T y B, mastocitos), aunque las principales células productoras son los monocitos.

La IL-10 es una citocina que desempeña un papel muy importante en la inmunorregulación y la inflamación. Disminuye la expresión de otras citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) e inhibe la expresión de moléculas de histocompatibilidad de tipo II, así como otras moléculas implicadas en la respuesta inflamatoria en macrófagos. Estos efectos antiinflamatorios contrastan con sus efectos sobre los linfocitos B, donde actúa como un factor estimulante de la proliferación celular, así como de la secreción de inmunoglobulinas, y el cambio de isotipo a cadenas ligeras gamma [196]. La IL-10 inhibe citocinas asociadas con la inmunidad celular y la alergia, mientras que estimula la respuesta inmune humoral.

La IL-10 es una citocina antiinflamatoria de la que se han encontrado niveles de producción disminuidos en macrófagos y monocitos de pacientes asmáticos [197]. Mediante estudios de gemelos se ha demostrado que esta variabilidad en los niveles de producción de IL-10 tiene una base genética y una heredabilidad estimada de un 74% [198]. En el pulmón, las células mononucleares constituyen la fuente principal de IL-10. Se han realizado estudios de expresión

y se han detectado niveles inferiores de ARNm, y por tanto de proteína, en los individuos con asma, en contraste con individuos sin esta enfermedad. En las vías respiratorias de los individuos sanos, la IL-10 se expresa de manera constitutiva, contribuyendo a la disminución de la expresión de moléculas de B7 en los macrófagos alveolares, y por tanto suprimiendo su capacidad de presentar antígenos, es decir, impidiendo la inflamación. Estudios realizados en ratones muestran que la transcripción de este gen es constitutiva y que su regulación es post-transcripcional [199], lo que hace que posibles variaciones en su secuencia génica puedan estar relacionadas con diferentes fenotipos asmáticos [200].



**Figura 15.** Estructura cristalina de la IL-10 [201]

Se han descritos varios polimorfismos en la región promotora del gen *IL10*, incluyendo dos microsatélites y tres polimorfismos en las posiciones -1082 (rs 1800896), -819 (rs 1800871) y -592 (rs 1800872) [194]. Se ha asociado el haplotipo formado por estos polimorfismos a variaciones en los niveles de expresión de IL-10 [202]. Recientes estudios de asociación han encontrado diferencias en la distribución de estos haplotipos entre controles y pacientes con asma [203], lo que sugiere un componente genético en la desregulación de la respuesta inmunitaria mediada por IL-10. Estos polimorfismos también se asocian a determinadas características fenotípicas del asma como el recuento de eosinófilos y los niveles de IgE [204].

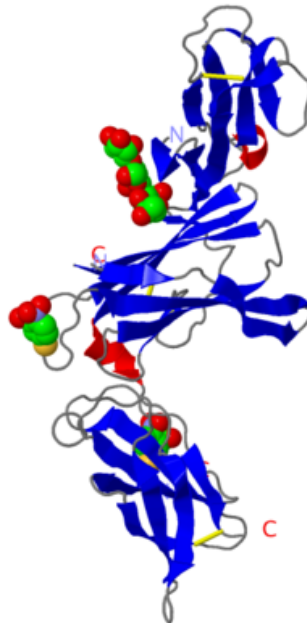


## IL-12

La IL-12 es un heterodímero formado por una subunidad de 35 KDa (p35 o subunidad  $\alpha$ ) y otra subunidad de 40 KDa (p40 o subunidad  $\beta$ ). Es una citocina que actúa sobre los linfocitos T y NK, y tiene una amplia gama de actividades biológicas.

El gen que codifica la IL-12 $\beta$  se encuentra localizado en el cromosoma 5 (5q31) región que contiene numerosos genes implicados en la respuesta inmune (*IL3*, *IL4*, *IL5*, *IL9*, *IL13*, *CD14*) y el gen del *receptor  $\beta$ 2-adrenérgico*). Ocupa 15,6kb y tiene 8 exones, de los cuales el primero y el último no son codificantes [205].

La subunidad IL-12 $\beta$  (p40) (Figura 16) es una proteína de 328 aminoácidos que forma un heterodímero con p35 debido a la interacción de los residuos de p35 y p40 mediante puentes disulfuro para formar una única estructura (p70), que es la IL-12 activa [206].



**Figura 16.** Estructura de la p40 de la IL-12 [207]

Esta citocina es expresada por macrófagos activados y funciona como un inductor esencial del desarrollo de la respuesta Th1, al aumentar los niveles de IFN- $\gamma$ , suprimiendo de ese modo la respuesta Th2. Esta capacidad de dirigir las respuestas Th2 hacia Th1 ha sido demostrada en numerosos estudios [208]. La IL-12 es también importante en la inmunidad celular contra muchas infecciones bacterianas y parasitarias, y su deficiencia predispone a graves infecciones por micobacterias o *Salmonella*, así como a episodios recurrentes de neumonía [205].

El gen *IL12B* es un gen candidato en el asma debido a su papel en la modulación de la respuesta Th1/Th2, desviando la ruta hacia la generación de células Th1 e IFN $\gamma$  al tiempo que inhibe la liberación de citocinas inductoras de respuestas Th2, como la IL4. Las deficiencias en los niveles de IL-12 pueden llevar al sistema inmune a una respuesta de tipo Th2, vía crucial en la inflamación de las vías respiratorias observada en asma. Además, el gen de IL-12B es también un buen candidato por la región genómica en que se encuentra, junto a otros genes ligados al asma [209]. El polimorfismo en posición 1888 3'UTR (rs 3212227) ha sido asociado con el asma infantil [210].

## **IFN- $\gamma$**

El interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) o interferón de tipo II es una citocina crítica en la respuesta innata y adaptativa contra infecciones por virus o bacterias intracelulares, así como en el control de tumores. Es también una molécula fundamental en la respuesta adaptativa, gracias a sus efectos inmunoestimuladores e inmunorreguladores. Es producida principalmente por linfocitos citolíticos espontáneos (*Natural Killer*) y por linfocitos T citotóxicos como parte de la respuesta innata, y por linfocitos T y células presentadoras de antígenos en la respuesta adaptativa [211].

El gen que codifica el IFN- $\gamma$  ocupa 5kb en el brazo largo del cromosoma 12 (12q14). Contiene cuatro exones y tres intrones, además de un VNTR en posición 1349, lo que le diferencia de otros tipos de interferones [212]. La forma activa de la proteína contiene 143 aminoácidos y forma un homodímero que ejerce su función como molécula soluble cuando es excretada al exterior celular y se une al receptor de IFN- $\gamma$  (IFNGR1, 2), activando la ruta molecular JAK/STAT.

A diferencia de los interferones  $\alpha$  y  $\beta$ , que pueden expresarse en todos los tipos celulares, el IFN- $\gamma$  es secretada fundamentalmente por linfocitos Th1, T citotóxicos, células dendríticas y células NK. Esta citocina ejerce efectos antivirales, inmunorreguladores y antitumorales [213]. Es responsable de modificaciones transcripcionales de hasta 30 genes, lo que produce una gran variedad de respuestas fisiológicas y celulares. Entre estos efectos se encuentran: mayor presentación antigénica en los macrófagos; incremento de la actividad de los lisosomas también en los macrófagos; inhibición de la respuesta Th2; incremento en la expresión de moléculas de histocompatibilidad del tipo I en células normales; activación de células NK; activación de células presentadoras de antígenos y promoción de la diferenciación de linfocitos Th1.

Se ha relacionado la presencia de 12 repeticiones CA en el VNTR, descrita en posición 1349 del gen *IFNG* y asociada a mayores niveles de expresión génica [214], con diversas enfermedades como por ejemplo la anemia aplásica [215]. Pravica y col. (2000) [216] propusieron que esta asociación se debe a que el VNTR se encuentra fuertemente ligado a un polimorfismo A>T presente en posición 874 (rs 2430561), que forma parte de la secuencia de unión del factor de transcripción NFK $\beta$ , por lo que podría ser el responsable de la modificación de la expresión de la proteína. Recientemente Hussein y col. (2009) han estudiado este

polimorfismo en pacientes atópicos, encontrando una mayor presencia del genotipo homocigoto mutado, además de niveles séricos de IFN- $\gamma$  más bajos [217] en los pacientes.

## **TGF- $\beta$**

La citocina TGF- $\beta$ 1 (factor transformador del crecimiento  $\beta$ ) representa a una familia de péptidos cuya función es regular el crecimiento celular [218]. Se produce principalmente en condrocitos, osteocitos, fibroblastos, plaquetas, monocitos y linfocitos T. Está codificada por un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 19 (19q13), que ocupa 23 Kb (7 exones). El TGF- $\beta$ 1 es sintetizado como un precursor inactivo de 390 aminoácidos que requiere un procesamiento proteolítico para su activación [219]. El péptido activo consta de 112 aminoácidos y forma un homodímero de 25 KDa en el que ambos monómeros se unen mediante puentes disulfuro [218].

Esta citocina desempeña un papel fundamental en el control del sistema inmune y ejerce efectos diferentes en función del tipo celular sobre el que actúe [220]. Actúa estimulando la fibrosis, la formación de la matriz extracelular y la cicatrización. En la respuesta inmunológica actúa como inhibidor de los linfocitos B y T (colaboradores y citotóxicos). Inhibe la secreción de inmunoglobulina en linfocitos B y la citotoxicidad de fagocitos mononucleares y células NK. En general, inhibe la proliferación de diversos tipos celulares. La producción de TGF- $\beta$ 1 en células apoptóticas crea un ambiente de inmunosupresión que explica la ausencia de inflamación como consecuencia de la muerte celular [221]. Sin embargo esta citocina funciona como quimioatrayente para los macrófagos y produce el cambio de isotipo hacia IgA en las células B [222].

En la inflamación alérgica, los eosinófilos suponen la principal fuente de TGF- $\beta$ 1 y su expresión se asocia al remodelado del epitelio bronquial característica del asma [223]. Sus

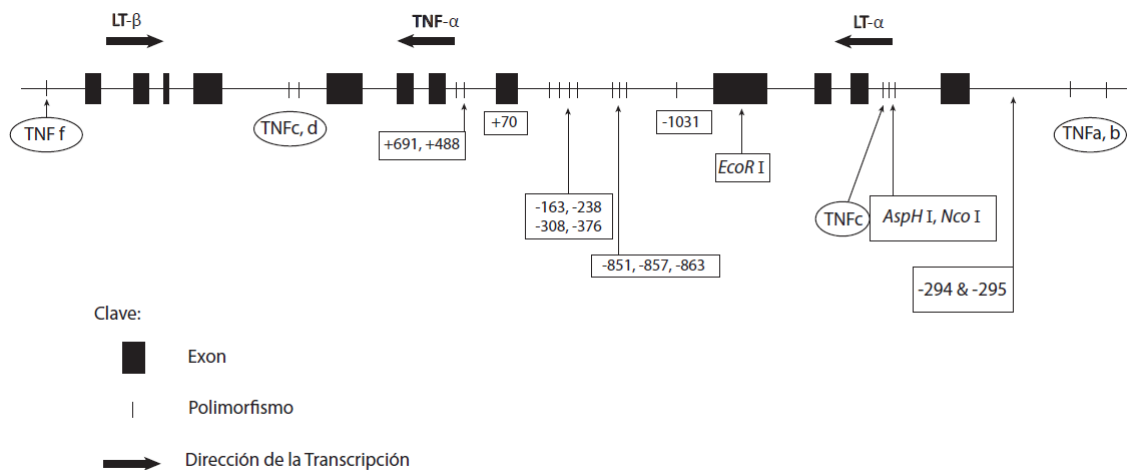
niveles se encuentran elevados en el lavado broncoalveolar de los pacientes con asma, siendo éste incremento más acentuado tras la exposición a antígenos respiratorios [224]. Se ha estudiado la asociación de distintos polimorfismos presentes en el gen TGFB1 con el asma y sus síntomas característicos. Uno de los polimorfismos más estudiados es el que se encuentra en posición -590. La presencia del alelo mutado se ha asociado a una mayor predisposición al asma relacionada con un posible aumento en los niveles de transcripción, tanto en niños [225] como en adultos [226]. El SNP -590 C>T también se ha asociado a la rinosinusitis [227], niveles aumentados de IgE [228] e hiperreactividad bronquial [229]. Otros polimorfismos que también se han asociado a una mayor expresión de la citocina y se encuentran en la región codificante son el 869T>C [230], que produce un cambio de prolina por leucina en el décimo aminoácido y el 915G>C (rs: 1800471), que produce un cambio de arginina por prolina en posición 25 [231]. Ambos han sido asociados a la hiperreactividad bronquial [229] y a la predisposición al asma [232]. Recientemente, se ha asociado al polimorfismo en posición 915 a la obstrucción irreversible al flujo aéreo en varones con asma.

### **TNF- $\alpha$**

El TNF-  $\alpha$  es una citocina pleiotrópica producida fundamentalmente por los macrófagos y células T [233]. Se identificó originalmente en suero de ratón estudiando la necrosis hemorrágica de tumores producida por la endotoxina [234].

Como otras citocinas inflamatorias, se ha relacionado con diversas enfermedades y síndromes como la psoriasis [235], la espondilitis anquilosante [236], la artritis reumatoide [237], el síndrome metabólico [238], el choque séptico [239] o la Malaria cerebral [240], entre otras.

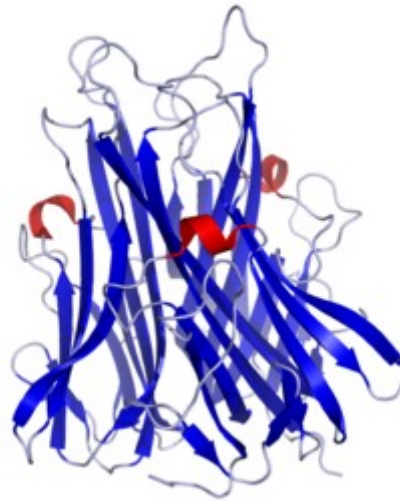
El gen *TNFA* fue clonado en 1985 [241]. Se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6, en la zona 6p21.3, región en que también se localiza el complejo principal de histocompatibilidad. Está localizado entre los genes de la *linfotoxina α* (*TNF-B*) y *LTB* (Figura 17). Ocupa aproximadamente 3kb y contiene 4 exones de 360, 46, 48 y 1221 pb. El último exón es el que codifica aproximadamente el 89% de la proteína soluble (forma activa) [242].



**Figura 17.** Región cromosómica conocida como complejo genético del TNF [243].

El precursor del TNF  $\alpha$  es una proteína transmembranaria del tipo II de 212 aminoácidos que forma heterotrimeros [244]. A partir de esta forma de membrana se libera la forma soluble (sTNF) gracias a un procesamiento proteolítico llevado a cabo por la metaloproteasa ADAM17 [245]. Dicha solubilidad le confiere un amplio rango de actividades inflamatorias e inmunomoduladoras que son importantes en los mecanismos de defensa frente al huésped. La forma trimérica soluble de 51kDa tiende a disociarse a concentraciones por debajo del rango nanomolar, perdiendo así su actividad biológica.

En cuanto a la estructura proteica de los monómeros de TNF  $\alpha$  están compuestos de dos láminas  $\beta$  antiparalelas plegadas (Figura 18), formando una estructura molecular típica de la familia del TNF, también presente en proteínas de cápsides virales.



**Figura 18.** Estructura del cristalografía del *TNFA*[246]

El aumento de la expresión de TNF  $\alpha$  está regulado en distintas etapas: transcripción, post-transcripción, estabilidad del ARNm y procesamiento de la zona de membrana para liberar la forma soluble y la expresión de receptores. El TNF ejerce su función mediante su unión a receptores de TNF (TNFR). Hay varios miembros de la familia TNFR, pero los más estudiados son los primeros en descubrirse: TNFR1 (CD120a; p55/60) y TNFR2 (CD120b; p75/80).

El TNF  $\alpha$  parece tener una mayor afinidad por el TNFR2, y se une a él a concentraciones inferiores. El TNF  $\alpha$  ejerce su influencia como citocina proinflamatoria y su efecto sobre células T a través de vías de transmisión de señales activadas por su unión al receptor [247]. El TNFR1 se expresa en la mayoría de los tejidos y puede ser activado tanto por la forma unida a membrana como por las formas solubles triméricas de TNF  $\alpha$ , mientras que el TNFR2 únicamente se encuentra en las células del sistema inmunitario y responde a las formas unidas a membrana del homotrímero de TNF  $\alpha$ . Como la mayoría de la información acerca de las vías de transmisión de señales que activa el TNF  $\alpha$  ha sido estudiada en el TNFR1, el papel del TNFR2 probablemente esté infraestimado.

Tras el contacto con su ligando, los receptores del TNF  $\alpha$  forman a su vez trímeros. Esta unión causa un cambio conformacional en el receptor, que lleva a que la proteína inhibidora del dominio de muerte intracelular del receptor (SODD) se separe del mismo. Esta disociación permite que la proteína adaptadora TRADD (*Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*) se una al dominio de muerte, actuando como una plataforma a la que se unen otras proteínas. Una vez se ha producido la unión de TRADD, pueden iniciarse tres rutas [248, 249]:

- Activación de NF- $\kappa$ B: Como se ha comentado, se trata de un factor de transcripción heterodimérico que penetra en el núcleo y media la transcripción de un amplio conjunto de proteínas involucradas en la supervivencia y proliferación celular, la respuesta inflamatoria, así como factores anti-apoptóticos.
- Activación de las rutas MAP-K: de las tres principales cascadas de las MAPK, el TNF induce una activación importante de JNK, factor que también actúa en el núcleo, activando factores de transcripción como c-Jun y ATF2. La vía de la JNK está involucrada en la diferenciación y proliferación celular, y generalmente ejerce efectos pro-apoptóticos.
- Inducción de la muerte celular: como todos los receptores de la superfamilia del TNFR, el TNFR1 está involucrado en mecanismos de muerte celular [250]. Sin embargo, las rutas de inducción de muerte del TNF  $\alpha$  tienen un efecto reducido en comparación con sus importantes funciones en el proceso inflamatorio. Su capacidad de inducción de muerte es despreciable en comparación con otros receptores de la misma familia, y con frecuencia se encuentra enmascarada por los efectos antiapoptóticos del NF- $\kappa$ B.



Este amplio abanico de respuestas, muchas de ellas antagónicas, confiere al factor de necrosis tumoral la pleiotropía característica de las citocinas, ya que cuando éste se libera, varios tipos celulares pueden ejercer funciones y condiciones muy diversas que conducen a la inflamación.

Se han descrito numerosos polimorfismos en el gen TNFA, la mayoría de ellos localizados en la región promotora (-1031, -851, -308, -238, entre otros) aunque en general son poco frecuentes en sujetos de raza blanca [239]). El polimorfismo (-308) se ha relacionado con los niveles de producción de TNF  $\alpha$  [243]; algunos estudios sostienen que la presencia del alelo A influye en la expresión del TNF  $\alpha$  [251], [252]. Winchester y col. (2000) [253] estudiaron la asociación del polimorfismo con el asma infantil y llegaron a la conclusión de que la presencia del alelo A o una variante del mismo ligada al complejo principal de histocompatibilidad podría ser un factor de riesgo genético en el desarrollo de asma infantil en una población del Reino Unido e Irlanda. Otros estudios apoyan estas conclusiones [254-256].

El polimorfismo -238 se ha asociado con distintas enfermedades: El genotipo A>G parece ser un factor influyente en la supervivencia de los pacientes con fibrosis quística [257]. Por otra parte, en los pacientes con colitis ulcerosa, la presencia del alelo mutado (A) en la posición -238 del gen de TNF  $\alpha$  se ha asociado con baja producción de TNF $\alpha$ [258].



# HIPÓTESIS DE TRABAJO

---





## 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El asma es una enfermedad multifactorial en la que influyen tanto factores ambientales como genéticos. En los últimos años se han identificado numerosos genes relacionados con el asma. Los estudios de polimorfismos en dichos genes han intentado determinar su influencia en el desarrollo de esta entidad. Siendo, como es, el asma una enfermedad con un marcado componente inflamatorio, muchos de los genes identificados son genes que codifican citocinas, moléculas esenciales en el desarrollo de las respuestas inflamatorias.

Nuestra principal hipótesis de trabajo es que la presencia de ciertas variantes génicas en determinados genes que codifican citocinas podría estar relacionada con el asma y con sus distintos tipos y gravedad.

La hipótesis secundaria es que los distintos tipos y gravedad de asma podrían estar determinados, además, por combinaciones haplotípicas (en el mismo gen o, en su caso, cromosoma) o por combinaciones de polimorfismos pertenecientes a distintos genes (epistasia).



# OBJETIVOS

---







### 3. OBJETIVOS

1. Caracterizar 22 polimorfismos de 13 genes que codifican distintas citocinas (*IL-1A*, *IL-1B*, *IL-1R*, *IL-RN*, *IL-2*, *IL-4*, *IL-4RA*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-12*, *IFN-G*, *TGF-B1*, *TNF-A*) en una muestra de pacientes con distintos tipos y gravedad de asma, así como en una muestra control representativa de la población.
2. Analizar dichos polimorfismos individualmente con la finalidad de evaluar las posibles asociaciones de los mismos con los distintos tipos y grados de asma.
3. Determinar la presencia de posibles interacciones génicas, así como de haplotipos y diplotipos en el caso de polimorfismos localizados en el mismo gen o cromosoma, con el fin de identificar variantes génicas que pudieran influir en la manifestación de la enfermedad asmática.
4. Tratar de identificar posibles marcadores génicos que fueran capaces de permitir la caracterización de los pacientes analizados, lo que podría, en un futuro, predecir el riesgo de desarrollar asma e incluso mejorar la calidad del manejo clínico de dichos pacientes.



# MATERIAL Y MÉTODOS

---





## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### ***4.1 ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES***

En este estudio se han analizado un total de 376 individuos no relacionados que acudieron al Servicio de Inmunoalergia del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, previo consentimiento informado, siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

Todos los individuos fueron examinados por un Facultativo especialista en Alergología que valoró en cada uno de ellos una serie de variables que se incluyeron en el estudio y se detallan a continuación.

#### **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 registró la edad, el sexo y la fecha de nacimiento, así como la fecha de consulta.

#### **DATOS CLÍNICOS Y ANÁLITICOS**

##### ***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) [259]. 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 [260]. 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 característica de asma.

### **GRAVEDAD DE 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*) [1]; si el paciente estaba recibiendo tratamiento se utilizó la clasificación adaptada:

#### ➤ 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  $FEV_1 < 20\%$

#### ➤ ASMA LEVE PERSISTENTE

- Aparición de síntomas más de una vez a la semana pero no todos los días.
- Las crisis pueden afectar la actividad diaria y el sueño.
- Episodios nocturnos más de dos veces al mes.
- $FEV_1$  o PEF  $\geq 80\%$

- Variabilidad del PEF o FEV<sub>1</sub> <20% - 30%

➤ ASMA MODERADA PERSISTENTE

- Síntomas diarios.
- Las crisis pueden afectar la actividad diaria y el sueño.
- Uso diario de β-2 agonistas inhalados.
- FEV<sub>1</sub> o PEF 60-80%
- Variabilidad del PEF o FEV<sub>1</sub> >30%

➤ ASMA PERSISTENTE GRAVE

- Síntomas diarios.
- Crisis frecuentes.
- Episodios asmáticos nocturnos frecuentes
- Limitación en las actividades físicas
- FEV<sub>1</sub> o PEF < 60%
- Variabilidad del PEF o FEV<sub>1</sub> >30%

**VALORACIÓN DEL ASMA ALERGICA**

Para determinar si se trataba o no de una asma alérgica se realizaron pruebas cutáneas y determinación de IgE total y específica.

PRUEBAS CUTÁNEAS

Las pruebas intraepidérmicas (*prick*) se realizaron siguiendo las recomendaciones del Subcomité para la normalización de alérgenos y pruebas cutáneas de la EAACI (*The European Academy of Allergy and Clinical Immunology*) [261] con una batería estandarizada de

aeroalérgenos comunes en nuestro entorno que incluía: *Dermatophagoides pteronissynuss*, *D. farinae*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tirophagus putrescentiae*, *Euroglyphus maynei*, *Acarus siro*, *Glycyphagus domesticus*, mezcla de gramíneas, mezcla de árboles, *Parietaria judaica*, *Chenopodium album*, *Artemisia vulgaris*, *Plantago ovata*, *Olea europaea*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus fumigatus*, epitelios de perro, gato, hámster, caballo y conejo y cucaracha (ALK-Abelló, Madrid, España). Se empleó una solución de histamina 10 mg/ml como control positivo y una solución salina como control negativo. Antes de realizar la prueba, se retiraron los antihistamínicos que el paciente pudiera estar tomando, según las indicaciones de la EAACI [261].

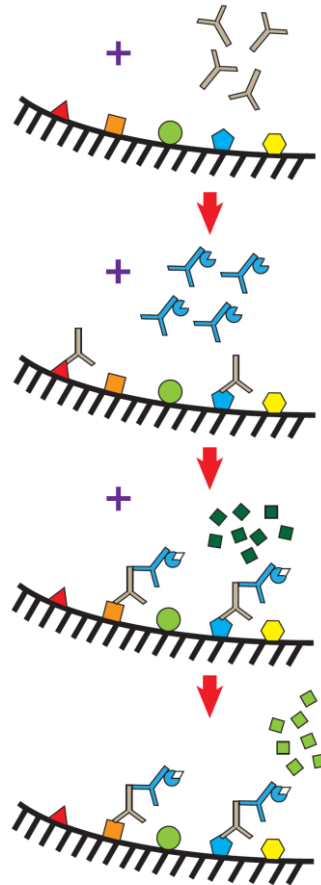
La prueba consiste en realizar una punción en la epidermis utilizando una lanceta con una punta de 1 milímetro, atravesando, de modo perpendicular, una gota del extracto alérgico que se quiere estudiar, además de una gota de las soluciones de control positivo y negativo. Se consideró un resultado positivo si se producía una pápula igual o superior a 3 mm de diámetro, una vez descontado el diámetro del control negativo si se había producido pápula en él. El diagnóstico de atopia se estableció ante la presencia de una prueba positiva frente al menos un alérgeno tras la realización de las pruebas cutáneas. Se consideró que el paciente presentaba alergia frente a un determinado alérgeno si existía una prueba positiva y unas manifestaciones clínicas concordantes.

#### DETERMINACIÓN DE IgE

A todos los individuos se les realizó una extracción de suero en tubo sin anticoagulante, mediante una punción de sangre venosa realizada según el procedimiento estándar.



Los niveles de IgE se determinaron mediante enzimoimmunoanálisis (Figura 19) siguiendo las recomendaciones del fabricante (Phadia InmunoCAP 250, Uppsala, Suecia) en muestras de suero de los pacientes. El InmunoCAP Total IgE es una prueba in vitro para la cuantificación de IgE total circulante en muestras de suero humano. La técnica se basa en un fluoroenzimoimmunoanálisis, en el que los anticuerpos anti-IgE unidos covalentemente a los pocillos del InmunoCAP, 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. Tras la incubación se añade una solución para detener la reacción, y posteriormente se mide la fluorescencia del eluido. Para evaluar los resultados de las pruebas, las unidades de respuesta se transforman en concentraciones utilizando una curva patrón.



**Figura 19.** Determinación de IgE. InmunoCAP 250 (Phadia, Sweden Diagnostics).

## FORMULARIO DE RECOGIDA DE DATOS

Los datos del paciente quedaron recogidos en una hoja de laboratorio cumplimentada por el facultativo (Figura 20).



## **CONTROLES**

Se incluyeron en el grupo un total de 157 individuos que acudieron al Servicio de Inmunoalergia del Complejo Asistencial de Salamanca y otorgaron su consentimiento informado y cumplían los siguientes criterios:

- Edad superior a 18 años.
- Ausencia de síntomas y antecedentes de asma.
- Ausencia de síntomas y antecedentes de otras enfermedades respiratorias.
- Ausencia de síntomas y antecedentes de alergia.
- Pruebas cutáneas negativas con la misma batería de aeroalérgenos.
- Ausencia de antecedentes de asma en familiares de primer grado.
- Ausencia de antecedentes de atopia en familiares de primer grado.

## **PACIENTES**

Participaron en el estudio 219 pacientes que acudieron al Servicio de Inmunoalergia del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca y fueron diagnosticados de asma por los facultativos especialistas del Servicio según los criterios anteriormente indicados.

## **4.2 ANÁLISIS MOLECULAR**

### **OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE ADN**

A todos los individuos se les realizó una extracción de una muestra de sangre periférica, recogidas en tubos de vacío con EDTA como anticoagulante y almacenadas a -20°C hasta el momento de la extracción de ADN.

### **EXTRACCIÓN DE ADN**

Se han seguido dos protocolos diferentes de extracción de ADN a partir de sangre total: uno de ellos utilizando el kit comercial DNAPURE “SSS” (Genedan S.L, Spain.); y otro utilizando el sistema MagnaPure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I- Large Volume (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). Una vez extraído el ADN, se determinó su concentración y su pureza. El estudio comenzó extrayendo las muestras utilizando el kit DANAPURE “SSS”, pero cuando se puso a punto el sistema de genotipado de citocinas se cambió al sistema MagNA Pure. Esto se debió a que el rendimiento del protocolo de extracción manual no era homogéneo, sin embargo, con el sistema automático se conseguía una concentración de ADN muy homogénea y de buena calidad, condiciones indispensables para conseguir un genotipado aceptable.

### **EXTRACCIÓN DE ADN MEDIANTE DNAPURE “SSS”**

La sangre está compuesta por diferentes tipos celulares, aunque los más abundantes son los hematíes. El primer paso de un protocolo de extracción de ADN a partir de sangre total es eliminar los hematíes. En el kit DNAPURE “SSS”, la eliminación de los hematíes se lleva a cabo utilizando una solución de lisis de hematíes (Solución de lisis RBC): 1 mL de la sangre del

paciente se incubó con 3 mL de solución RBC durante 10 minutos a temperatura ambiente, invirtiendo el tubo varias veces durante la incubación.

Pasados esos 10 minutos, las muestras se centrifugaron a 3.000 revoluciones por minuto (r.p.m.) y se eliminó el sobrenadante en el que se encontraban los restos de los hematíes, con una pipeta de tipo pasteur.

El botón se resuspendió utilizando un agitador tipo "vórtex" y se añadió 1 mL de solución de lisis, compuesta por un detergente aniónico cuya función es romper la membrana de los leucocitos, principales células nucleadas de la sangre, dejando así los componentes celulares en suspensión.

El siguiente paso implicó la eliminación de proteínas celulares y nucleares mediante una precipitación salina, consistente en la adición de 600 µL de Solución de precipitación seguida de agitación en un agitador tipo "vórtex" durante 30 segundos y centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos.

El resultado de la centrifugación es un precipitado marrón oscuro y un sobrenadante limpio de partículas que contiene el ADN. Éste se transfirió a un tubo limpio con 1 mL de isopropanol y se agitó aproximadamente 50 veces, procediéndose después a una centrifugación de 3 minutos a 3.000 r.p.m. La función que lleva a cabo el isopropanol es precipitar el ADN.

El precipitado, que presenta un color blanquecino, se separó del sobrenadante, que se desechó. El precipitado se dejó secar durante aproximadamente 10 minutos con el fin de que se evaporasen los restos de isopropanol.

Posteriormente se añadió 1 mL de etanol al 70% para lavar el ADN y se centrifugó durante 10 minutos a 3.000 r.p.m. Una vez centrifugado, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado durante quince minutos.

Por último, se resuspendió el precipitado en 200 µL de agua destilada calentando las muestras durante una hora a 65°C en agitación.

### **EXTRACCIÓN DE ADN UTILIZANDO EL SISTEMA “*MagnaPure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I- Large Volume*”**

MagnaPure Compact (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) (Figura 3) es un sistema automatizado que permite extraer ácidos nucleicos de una amplia variedad de muestras (sangre total, suero, plasma, células en cultivo). Permite la extracción de muestras de ADN genómico de gran calidad, adecuadas para su uso en reacciones de PCR.

En este trabajo se ha utilizado el MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I – Large Volume, que permite extraer ADN genómico a partir de sangre total, plasma y células en cultivo. Cada kit contiene los reactivos y materiales necesarios para la extracción.

El equipo es un instrumento con un brazo de ocho cabezales para la inserción de las pipetas, que permite procesar ocho muestras simultáneamente. El cabezal posee un sensor que permite la detección de coágulos en la muestra. Los cartuchos que contienen los reactivos se insertan en una gradilla específica que se introduce en el instrumento.

La extracción del ADN se lleva a cabo utilizando un sistema de partículas magnéticas que consta básicamente de un cartucho con una serie de pocillos en los que se encuentran los reactivos de extracción. Es necesario poner un *rack* de puntas de pipeta estériles con filtro,

cuya función es aspirar la muestra y pasarla por los distintos pocillos que contienen los reactivos.

El protocolo consiste en la adición a la muestra de un tampón de lisis que contiene proteinasa K para destruir proteínas, Tritón X-100 (detergente que facilita la disrupción de las membranas celulares) e inhibidores de desoxirribonucleasas y ribonucleasas. Tras una incubación a temperatura elevada, se añade una solución con partículas magnéticas e Isopropanol, que consigue el aislamiento de las moléculas de ácidos nucleicos asociadas a las partículas. Tras una serie de pasos de lavado, en los que se incorpora una solución tampón de lavado y etanol a diferente pH (inicialmente pH 6,6 y luego pH 4) se produce la separación del ADN de la partícula magnética por calor y elución final con Tris-EDTA en el tubo de elución. En cada una de las extracciones se siguió el siguiente protocolo:

- Las muestras de sangre, que se habían mantenido almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se descongelaron gradualmente hasta alcanzar la temperatura ambiente.
- Una vez encendido el instrumento, se seleccionó el protocolo "DNA blood\_1000", para 1mL de muestra de sangre total y elución en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . Se introdujeron los cartuchos de reactivos en el carrusel tras la lectura del código de barras. Las puntas desechables también fueron colocadas en el equipo.
- Se dispensó 1 mL de muestra en un criotubo en la parte posterior del *rack* de muestras, debidamente identificado y ordenado según el número de laboratorio. Dicha identificación fue introducida en el ordenador del instrumento.
- Los tubos de elución se colocaron en la parte delantera del *rack* de muestras, identificando cada tubo con el número de laboratorio de la muestra y leyendo el código de barras para su correcta identificación en el ordenador del instrumento.



- Una vez identificados todos los componentes, se introdujeron en el aparato y se procedió a la extracción automática, de aproximadamente treinta y cinco minutos de duración.

### **EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE ADN**

La cantidad y calidad de muestra de ADN extraída puede ser un factor fundamental en el análisis genético de polimorfismos múltiples, por lo que una vez extraídas las muestras se procedió a evaluar el rendimiento mediante la determinación de la absorbancia a 260nm y a 280nm en el espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

La absorbancia fue medida en un volumen final de 100  $\mu$ L, tras hacer una dilución de las muestras al 1/50, mediante la adición de 2  $\mu$ L de la muestra problema a 98  $\mu$ L de agua destilada. Todas las diluciones se midieron por triplicado, anotando la absorbancia a 260 nm y la ratio 260/280.

### **ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS**

Se han analizado un total de 22 polimorfismos de 13 citocinas diferentes en un total de 376 individuos, lo que constituye un total de 8272 polimorfismos genotipados. Las citocinas y los polimorfismos analizados se muestran en la Tabla 1.

### **AMPLIFICACIÓN DE LOS SNP**

En el genotipado se ha utilizado un sistema conocido como "*Cytokine genotyping Kit*", desarrollado por el Departamento de Inmunología de la Universidad de Heidelberg (Alemania), distribuido por Invitrogen™ (Deerbrook Trail USA) y certificado por la Comunidad Europea de acuerdo a los requerimientos de la Directiva para el Diagnóstico In Vitro 98/79/EC.

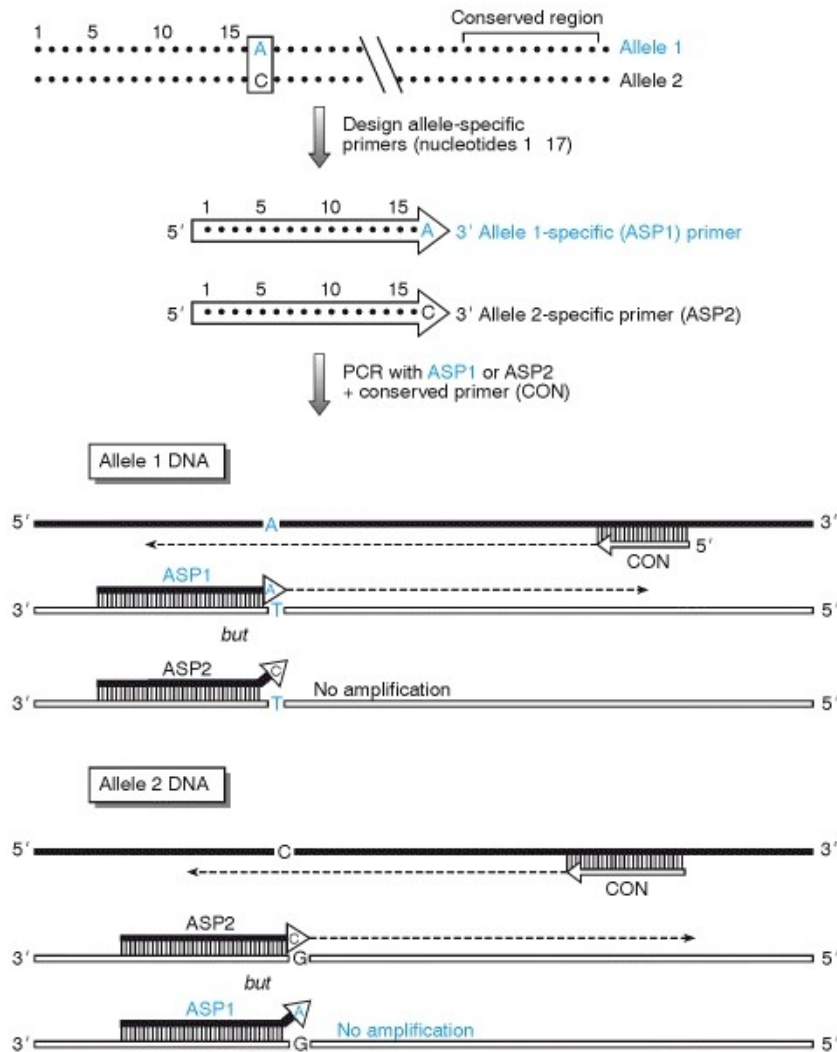
Es un sistema basado en la reacción en cadena de la polimerasa mediante cebadores específicos de secuencia SSP-PCR (*sequence specific primers polymerase chain reaction*) que permite un análisis rápido de mutaciones conocidas (Figura 21). Se trata de un método que consiste en la realización de una reacción de PCR utilizando cebadores específicos de alelo, en los cuales el nucleótido del extremo 3' es complementario a una de las variantes del sitio polimórfico que se pretende analizar. Este cebador sólo podrá ser extendido eficientemente cuando su extremo 3' empareje perfectamente con el ADN molde de la muestra [262]. Para genotipar cada polimorfismo se realizaron dos reacciones de PCR independientes, usando cada una un cebador específico de alelo diferente y compartiendo un cebador diseñado para unirse a una región invariable. La obtención de amplificación delata la presencia en la muestra de la variante detectada por el cebador específico de alelo utilizado.

**Tabla 1.** Polimorfismos analizados en el estudio

GEN	Identificación NCBI	NOMBRE (Heidelberg system)
<b>IL-1A</b>	rs 1800587	<i>IL-1A -889 C&gt;T</i>
<b>IL-1B</b>	rs 16944 rs 1143634	<i>IL-1B -511 C&gt;T</i> <i>IL-1B 3954 C&gt;T (IL-1B 3962)</i>
<b>IL-1R1</b>	rs 2234650	<i>IL-1R1 pstI A C&gt;T (IL-1R1 pstI 1970)</i>
<b>IL-1RN</b>	rs 315952	<i>IL-1RN pos 30,735 T&gt;C IL-1RN Mspal</i>
<b>IL-2</b>	rs 2069762 rs 2069763	<i>IL-2 -714 T&gt;G(IL-2 -330)</i> <i>IL-2 114 G&gt;T (IL-2 166)</i>
<b>IL-4</b>	rs 22432484 rs 2243250 rs 2070874	<i>IL-4 -1098 T&gt;G</i> <i>IL-4 -589 C&gt;T (IL-4 -590)</i> <i>IL-4 -33 C&gt;T</i>
<b>IL-4R</b>	rs 1801275	<i>IL-4R Gln221Arg A&gt;G(IL-4R 1092)</i>
<b>IL-6</b>	rs 1800795 rs 1800797	<i>IL-6 -174 G&gt;C</i> <i>IL-6 -597 G&gt;A (IL-6 nt565)</i>
<b>IL-10</b>	rs 1800872 rs 1800871 rs 1800896	<i>IL-10-592 C&gt;A</i> <i>IL-10 -819 C&gt;T</i> <i>IL-10 -1082 A&gt;G</i>
<b>IL-12B</b>	rs 3212227	<i>IL-12B pos 1188 A&gt;C (IL-12B -1188)</i>
<b>IFN-G</b>	rs 2430561	<i>IFN-G 874 A&gt;T</i>
<b>TGFB-1</b>	rs 1982073 rs 1800471	<i>TGFB-1 869 T&gt;C (TGFB-1 codon 10)</i> <i>TGFB-1 915 G&gt;C (TGFB-1 codon 25)</i>
<b>TNF-A</b>	rs 361525 rs 1800629	<i>TNF-A -238 G&gt;A</i> <i>TNF-A -308 G&gt;A</i>

Los 22 polimorfismos se determinan en un total de 48 pocillos, cada uno de los cuales contiene una pareja de oligonucleótidos específicos de uno de los alelos, además de un control

de amplificación positiva: un fragmento de 89 pb del gen de la  $\beta$ -globina en los pocillos de los polimorfismos de IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10; y un fragmento de 440 pb del gen de la proteína C reactiva humana en el resto.



**Figura 21.** SSP-PCR (Tomado de Human Molecular Genetics 2, Tom Strachan y Andrew P. Reader (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=hmg>))

Cada placa del kit de citocinas contiene la mezcla específica de oligonucleótidos liofilizados en una placa de PCR de 96 pocillos, por lo que en una misma placa pueden genotiparse simultáneamente dos individuos. Además de las placas, el sistema también incluye el tampón de reacción, con los desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) necesarios para la reacción,

pero no incluye la ADN polimerasa. En este estudio se ha utilizado la FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), cuyo uso es recomendado por el fabricante. Es una polimerasa termoestable, modificada a partir de la polimerasa recombinante de *Thermus aquaticus*, que se caracteriza por permanecer inactiva a temperaturas inferiores a 75°C y activarse tras un paso de incubación de 4 minutos a 95°C [263]. Esta cualidad minimiza la aparición de productos de amplificación inespecíficos, además de disminuir la dimerización de oligonucleótidos.

Para el genotipado de los pacientes se ha seguido el protocolo recomendado por el fabricante con algunas modificaciones que serán descritas posteriormente.

#### **PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN**

El primer paso es el descongelado de las muestras de ADN y dos viales de tampón de reacción necesarios para genotipar simultáneamente los dos pacientes: la descongelación se llevó a cabo en gradillas de frío, de manera que el cambio de temperatura tiene lugar de forma gradual.

Una vez descongeladas las muestras y el tampón se preparó la mezcla de reacción o *master mix* con los elementos que se detallan en la tabla 2.

La cantidad de ADN utilizada en cada paciente dependió del rendimiento obtenido en la extracción. Se ajustó la cantidad de ADN por paciente de manera que se añadiesen aproximadamente 14 µg totales de ADN para las 48 reacciones (aproximadamente 292,74 ng de ADN por reacción de PCR). El resto de volumen (hasta los 381 µL se completó con agua destilada).

**Tabla 2.** Elementos de la *master mix*

TAMPÓN DE REACCIÓN	<i>FastStart Taq DNA polymerase</i>	Agua destilada	ADN	Volumen final
140 $\mu$ L	4 $\mu$ L	306 $\mu$ L + 75 $\mu$ L		525 $\mu$ L
		381 $\mu$ L TOTALES		

El tampón de reacción proporcionado por la casa comercial dejó de funcionar a partir de un número de lote determinado, por lo que se cambió el tampón y se utilizó el Buffer GL Plus (Invitrogen).

Los primeros lotes de kits de reactivos recomendaban añadir 4  $\mu$ L de FastStart Taq DNA polymerase. A medida que fue avanzando el estudio el fabricante fue recomendando disminuir las cantidades de polimerasa, primero a 3,5  $\mu$ L, luego a 3,4  $\mu$ L y finalmente a 3,3  $\mu$ L.

Los componentes de la mezcla de reacción fueron añadidos en el siguiente orden: agua destilada libre de desoxirribonucleasas, tampón de reacción, muestra de ADN y polimerasa (la polimerasa se mantuvo a -20°C hasta el momento de ser añadida a la mezcla de reacción). Todos los componentes se añadieron en un tubo eppendorf estéril en gradilla fría debidamente identificado con el número de ADN asignado en el laboratorio. Posteriormente se mezclaron utilizando un agitador tipo “vórtex” seguido de un “toque” de centrifuga (*spin*). Una vez preparada la mezcla, se sacó la placa de PCR del congelador y se colocó en una gradilla fría para proceder dispensar 10  $\mu$ L de la mezcla de reacción. Al terminar de rellenar la placa, ésta se tapaba con un film especial de sellado para placas de PCR. La placa fue introducida en un termociclador TProfessional 96 Thermocycler, Whatman Biometra®, (Goettingen, Alemania).

**Tabla 3.** Programa de PCR recomendado por el fabricante

<b>ACTIVACIÓN DE LA POLIMERASA</b>		2min	94°C
<b>DESNATURALIZACIÓN</b>	10X	15seg	94°C
<b>1ª ELONGACIÓN</b>		60seg	65°C
<b>DESNATURALIZACIÓN</b>	20X	15seg	94°C
<b>2ª ELONGACIÓN</b>		50seg	61°C
<b>ELONGACIÓN FINAL</b>		30seg	72°C
<b>CONSERVACIÓN</b>			8°C

**Tabla 4 .** Programa de PCR utilizado en el kit

<b>ACTIVACIÓN DE LA POLIMERASA</b>		4min	94°C
<b>DESNATURALIZACIÓN</b>	10X	30seg	94°C
<b>1ª ELONGACIÓN</b>		60seg	65°C
<b>DESNATURALIZACIÓN</b>	20X	30seg	94°C
<b>2ª ELONGACIÓN</b>		50seg	65°C
<b>ELONGACIÓN FINAL</b>		60seg	72°C
<b>CONSERVACIÓN</b>			8°C

Los primeros pacientes fueron genotipados con el programa de PCR recomendado por el fabricante (tabla 3), pero el rendimiento de la técnica resultó ser muy bajo, por lo que se modificó a un programa cuyas características se detallan en la tabla 4, y que ha sido utilizado con todos los pacientes del estudio.

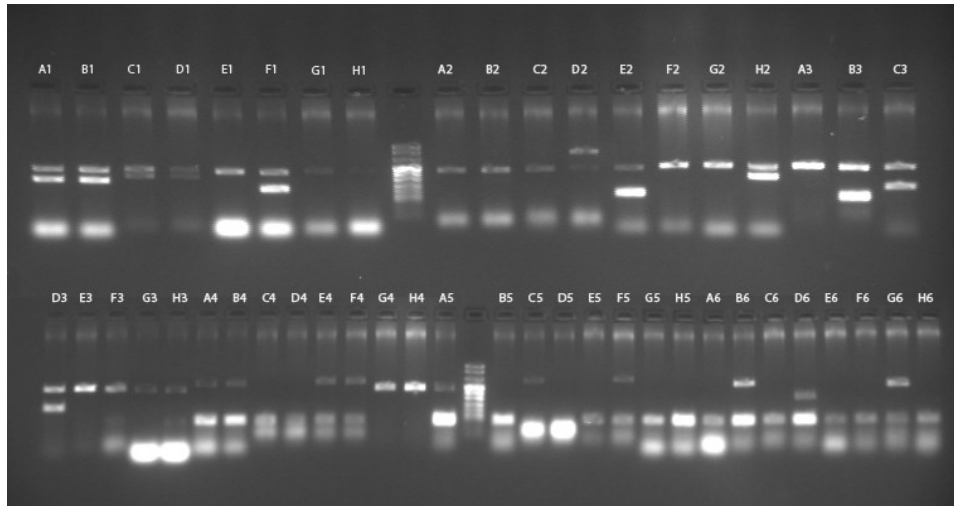
## **VISUALIZACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Los productos de PCR obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles horizontales de agarosa de alta resolución al 2%. Para su preparación se utilizó agarosa NuSieve® 3:1 Agarose (Cambrex Bio Science Rockland, Inc, EEUU) y tampón TAE (Tris-Acético-EDTA) al 0,5X, preparado a partir de una solución madre TAE Buffer 10X (Promega, Madison, USA), compuesto por 400 mM de Tris-acetato y 10 mM de EDTA a pH 8,2-8,4.

El gel se hizo disolviendo la agarosa en el TAE 0,5X en un horno microondas. Una vez enfriada la agarosa (hasta 50-60°C), se añadieron 10 µL de bromuro de etidio al 2% por cada 100 mL de gel y se depositó en la cubeta de electroforesis. El bromuro de etidio actúa intercalándose entre las hebras de ADN y emitiendo fluorescencia al ser iluminado con luz ultravioleta, lo que permite poner de manifiesto la presencia de ácidos nucleicos en el gel de agarosa. Una vez solidificada la disolución (aproximadamente 40 minutos, variable en función de la temperatura ambiente), se procedió a cargar la totalidad de los productos de PCR (10 µL) sin necesidad de añadir tampón de carga, ya que el tampón de reacción del kit contiene glicerol, que proporciona a las muestras la densidad necesaria para que vayan al fondo del pocillo en lugar de diluirse en el tampón de electroforesis.



En todos los geles se ha utilizado, como marcador de peso molecular el *DNA Molecular Weight Marker VIII* (Roche Applied Science, Manheim, Alemania), cuyo patrón de bandas oscila en un rango de tamaños de 1114 pb a 67 pb.



**Figura 22.** Visualización con luz UV de un gel de electroforesis.

La electroforesis se llevó a cabo utilizando como tampón TAE 0,5X y a 160 Voltios durante 20 minutos, tras los cuales el gel se colocó en un transiluminador de luz ultravioleta para ser analizados con el sistema fotográfico VisiDoc-It™ Imaging System (Uplant, CA, USA). En la figura 22 se muestra el resultado de la electroforesis de los 22 polimorfismos en un paciente.

### **INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

La interpretación de los resultados del kit se ha realizado utilizando una plantilla (figura 23) que asocia la posición de la reacción de PCR con el alelo del polimorfismo que se va a determinar.

	1	2	3	4	5	6
<b>A</b>	IL-1R T/1970 288	g-IFN T/874 277	TNFa A/-308//G/-238 110	IL4 T/-1098//C/-590 557	IL6 C/-174//G565 426	IL10 A/-1082//A/-592 530
<b>B</b>	IL-1R C/1970 288	g-IFN A/874 277	TNFa G/-308//G/-238 110	IL4 T/-1098//T/-590 557	IL6 G/-174//G565 427	IL10 A/-1082//C/-592 530
<b>C</b>	IL-1b C/+3962 336	IL-12 A/-1188 802	TGFb1 T/10 195	IL2 T/-330//T/166 569	IL4 C/-590//C/-33 610	IL10 A/-1082//T/-819 305
<b>D</b>	IL-1b T/+3962 336	IL-12 C/-1188 802	TGFb1 C/10 195	IL2 G/-330//T/166 569	IL4 C/-590//T/-33 610	IL10 A/-1082//C/-819 305
<b>E</b>	IL-1b T/-511 215	IL-4Ra A/1902 143	TGFb1 T/10-C/25 80	IL2 G/-330//G/166 564	IL4 T/-590//C/-33 610	IL10 G/-1082//C/-592 530
<b>F</b>	IL-1b C/-511 215	IL-4Ra G/1902 143	TGFb1 T/10-G/25 80	IL2 T/-330//G/166 562	IL4 T/-590//T/-33 610	IL10 G/-1082//C/-819 305
<b>G</b>	IL-1a C/-889 220	IL-1RA C/11100 297	TGFb1 C/10-C/25 80	TNFa A/-308//A/-238 110	IL4 G/-1098//C/-590 557	IL6 C/-174//A/565 428
<b>H</b>	IL-1a T/-889 220	IL-1RA T/11100 297	TGFb1 C/10-G/25 80	TNFa G/-308//A/-238 110	IL4 G/-1098//T/-590 557	IL6 G/-174//A565 428
		Control 440pb				
		Control 89				

**Figura 23.** Plantilla de interpretación de resultados: cada casilla corresponde a una coordenada de la placa de PCR. En ella se indican el alelo que amplifica, así como el tamaño de la banda producto. El sombreado indica el tamaño de la banda control que debe observarse.

Así, una vez efectuada la electroforesis y realizada la fotografía correspondiente, ésta se ha analizado utilizando el programa 12BitTiffReader V.11.1 (Vilber Lourmat). Cada carrera del gel fue cuidadosamente examinada para determinar si debía determinarse como positiva, negativa o no concluyente, en función de los siguientes criterios:

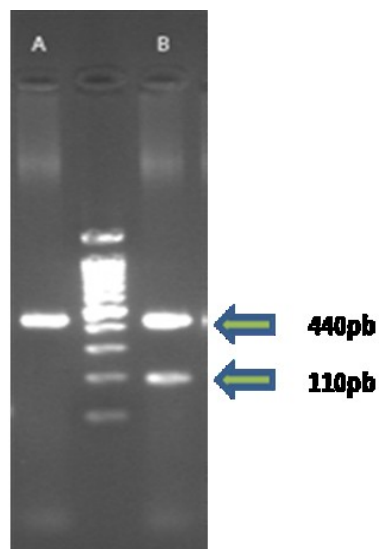
- Presencia de banda control de 89 pb en las carreras de los polimorfismos de *IL2*, *IL4*, *IL6* e *IL10* y de 440pb en las carreras de los polimorfismos de *IL1A*, *IL1B*, *IL1R*, *IL1RA*, *IL4RA*, *IL12*, *IFNG*, *TGFb* y *TNFa*. Se tuvieron en cuenta las recomendaciones del fabricante, que advertían que las bandas control podrían aparecer muy tenues o no aparecer si la amplificación del polimorfismo era muy patente debido a un fenómeno de competición por sustrato, ya que los oligonucleótidos de amplificación del control se encuentran a menor cantidad que los de los polimorfismos problema, para favorecer la reacción específica de alelo.

- Evaluación de la presencia o ausencia de la banda esperada, en función de su tamaño.
- Evaluación de la presencia de otras bandas de tamaño diferente al esperado.

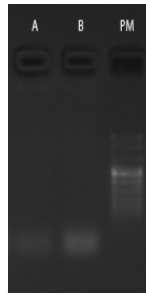
La amplificación se consideró negativa (Figura 24.A) cuando en la carrera de electroforesis se observó la banda control correspondiente pero no la banda de tamaño concreto, independientemente de la presencia o no de otra banda de diferente tamaño.

Se consideró una amplificación positiva cuando podía observarse en la carrera de electroforesis la banda del tamaño correspondiente, además de la banda control (Figura 24.B). Se tuvo en cuenta la posible ausencia del control cuando la banda problema era muy patente.

Aquellas reacciones en las que no se observaba la banda control y la banda problema era muy leve o no se apreciaba se consideraron no concluyentes, con lo que no se dio por válido el resultado (Figura 25).



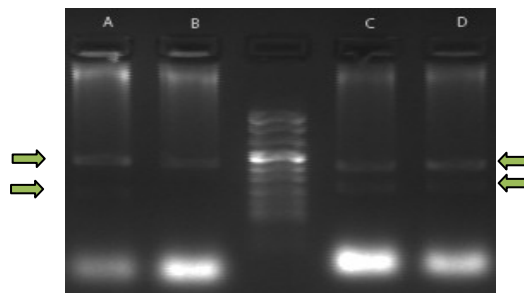
**Figura 24. A:** resultado de una amplificación negativa, ya que se observa una banda control de 440pb, pero no se observa la banda problema, que en ese caso debería tener 110pb. **B:** consideramos la amplificación positiva, ya que presenta tanto la banda control de 440pb como la banda problema de 110pb.



**Figura 25.** No se observan ni las bandas control ni las bandas problema, por lo que se considera que ha habido un fallo de amplificación y se determina que el resultado es no concluyente.

Una vez interpretado el gel y anotados los resultados en la hoja de interpretación se determinó, a partir de la misma, el genotipo de los polimorfismos, que fueron recogidos en una base de datos del paquete estadístico SPSS 17.0 (IBM, Chicago, Illinois).

La presencia de un genotipo concreto en un locus se determinó examinando todas las reacciones relativas a dicho locus, comprobando que fuesen coherentes y que en ninguna de ellas se hubiese obtenido un resultado no concluyente (Figura 26).

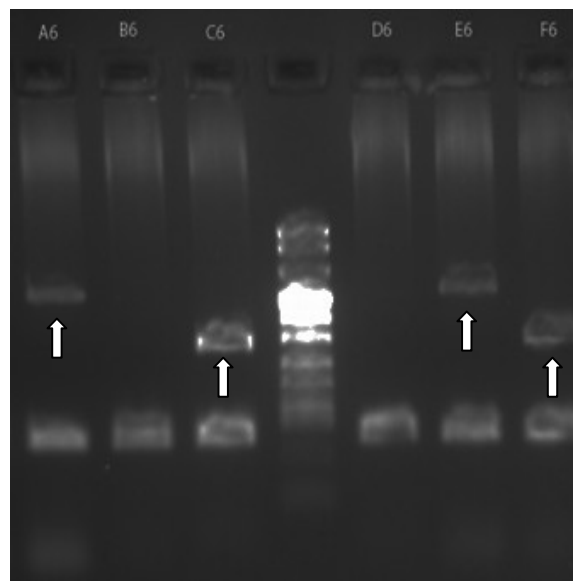


**Figura 26.** En esta figura se muestra en los carriles A y B las reacciones de amplificación del polimorfismo -889 C>T de *IL1A*. El pocillo A representa la mezcla de oligonucleótidos específica del alelo C y el pocillo B la mezcla específica del alelo T. En ambos casos, se observa la presencia de la banda control de 440 pb, pero la banda específica de amplificación, de 220 pb solo se observa en el carril A, por lo que debe interpretarse que el genotipo de este paciente para este polimorfismo es homocigoto normal CC. En los carriles C y D se muestran las reacciones de amplificación correspondientes al polimorfismo 874 T/A del IFN-G. El pocillo C representa la mezcla de oligonucleótidos específica del alelo

T y el pocillo D la mezcla específica del alelo A. Se observa banda control de 440 pb en ambos, además de la banda problema de 277 pb, por lo que debe interpretarse que éste individuo es heterocigoto A T para este polimorfismo.

### **INTERPRETACIÓN DE HAPLOTIPOS**

El kit de genotipado de citocinas, además de polimorfismos aislados, permite identificar haplotipos, ya que en algunos pocillos tiene oligonucleótidos específicos para dos polimorfismos del mismo gen con distinta posición. Para su correcta interpretación, se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en la amplificación de todos los pocillos relativos al gen (véase un ejemplo en la Figura 27).



**Figura 27.** En esta figura se muestra el resultado de la amplificación de los tres polimorfismos estudiados en el gen de IL-10. En el carril A6 hay oligonucleótidos específicos para el alelo A en posición -1082 y el alelo A en posición -592; el carril B6 para el alelo A -1082 y C -592; en el carril C6 para el alelo A -1082 y T -819; en el carril D6 para el alelo A -1082 y C -819; en el carril E6 para el alelo G -1082 y C -592; en el carril F6 para el alelo G -1082 y C-819. En todos los pocillos se observa la banda control de 89 pb (flecha horizontal), por lo que el genotipado se considera correcto. Además, se observan bandas

problema en los carriles A6 (530pb), C6 (305pb), E6 (530pb) y F6 (305pb) (flechas verticales). La presencia de estas bandas se interpretó según la tabla 5.

**Tabla 5.** Resultado del genotipado del haplotipo del paciente, que en este caso es **IL-10 -1082,-819,-519 ATA/GCC**, heterocigoto para los tres polimorfismos estudiados.

AMPLICIÓN	pos -1082	pos -819	pos -5924.
<b>A 6</b>	A		A
<b>C 6</b>	A	T	
<b>E 6</b>	G	C	
<b>F 6</b>	G		C

## CONTROL DE CALIDAD

Todos los procedimientos analíticos han sido llevados a cabo siguiendo las recomendaciones de la *European Molecular Genetics Quality Network* (EMQN) [264].

El primer punto de control del análisis se refiere a la fase preanalítica. En el momento de la recepción de las muestras. Todas ellas llegaron al laboratorio acompañadas de una hoja de recogida de datos clínicos identificada con un código de barras igual al presente en el tubo. Una vez en el laboratorio, tanto la hoja de datos, como el tubo de muestra fueron identificados con un número de identificación de laboratorio, y la información relativa al paciente fue introducida en una base de datos general almacenada en un ordenador del servicio de Inmunoalergia con acceso restringido y sin incluir datos personales identificativos. La hoja con

los datos clínicos de los pacientes también ha sido almacenada. Las muestras de sangre fueron alícuotadas en criotubos (1 mL de sangre por criotubo) debidamente identificados con el número de laboratorio tanto en el tubo como en la tapa, y almacenadas a -20°C, de manera que, además de la muestra para la extracción del ADN, se conservaron al menos dos alícuotas de seguridad. Con respecto al número de laboratorio, se utiliza una nomenclatura alfanumérica para evitar posibles errores derivados de la utilización exclusiva de números [264].

La extracción de ADN se realizó minimizando el riesgo de contaminación de las muestras. Se realizó en un laboratorio destinado exclusivamente a la extracción de ADN, utilizando en todo momento material estéril y puntas con filtro. El proceso de extracción de muestras se ha realizado, en la gran mayoría de las muestras, utilizando un sistema automático que permite minimizar las transferencias de tubo a tubo, además de contar con un sistema de códigos de barras que obliga al operador a mantener identificadas las muestras durante todo el proceso, y a hacer una revisión de dichas identificaciones en varios puntos del mismo.

Una vez extraída la muestras, éstas fueron almacenadas a -20°C en cajas identificadas con la serie de identificación de las muestras (A1, A2, A3). Para evitar múltiples ciclos de congelación/descongelación, que podrían alterar la calidad de las muestras, antes de sacar una muestra del congelador se planificó el trabajo para determinar las muestras necesarias, y así tenerlas el mínimo tiempo a temperatura ambiente. Además, para evitar cambios bruscos de temperatura, todas las muestras fueron mantenidas en frío hasta su correcta descongelación.

Todos los ensayos se realizaron atendiendo exclusivamente al número de laboratorio, desconociendo en todo momento si la muestra que se estaba procesando pertenecía a un control o a un paciente. En ningún caso se procesaron las muestras de los pacientes y de los controles en series separadas.

Para evitar posibles contaminaciones, la PCR se realizó en una cabina de flujo laminar esterilizada periódicamente con luz UV, utilizando pipetas automáticas dedicadas exclusivamente a esa función y puntas de pipeta con filtro de un solo uso. Todos los reactivos utilizados en este estudio son de fabricación comercial, evitando posibles errores en la elaboración de los mismos.

La interpretación de los resultados, como se ha descrito previamente, se realizó utilizando una plantilla que fue interpretada por duplicado en dos momentos diferentes. Las discrepancias entre las dos plantillas fueron confirmadas una tercera vez utilizando la imagen digital. Los datos deducidos a partir de las plantillas fueron almacenados en una base de datos junto con los datos clínicos de los pacientes.

### **ESTUDIO “IN SILICO”**

En este estudio se analizan 22 polimorfismos de 13 genes diferentes en individuos con unas características clínicas muy bien definidas, por lo que resulta esencial el conocimiento exhaustivo de cada una de las variantes estudiadas, prestando especial atención a su relación con la patología inflamatoria y el asma.

Dado la ingente cantidad de datos y la complejidad de los cálculos bioinformáticos parte del trabajo realizado en este estudio, se ha centrado en el análisis de bases de datos científicas a través de Internet que se detalla a continuación.

### **DESCRIPCIÓN DEL GEN**

Un primer abordaje del análisis informático es la definición de las características del gen de estudio. Para ello se hizo una búsqueda en GeneCard® (<http://www.genecards.org/>) (Figura 28), una página web sustentada por el *Weizmann Institute of Science*. Es una base de




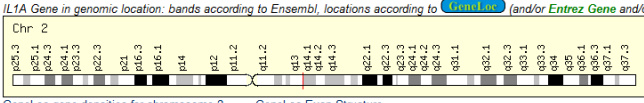
datos de genes humanos que proporciona información concreta sobre aspectos genómicos, proteómicos, transcriptómicos y funcionales de genes humanos.

The screenshot shows the GeneCards website interface. At the top, there's a navigation bar with links like 'Gene Search (GeneCards Home)', 'GeneCards Guide', 'User Feedback', 'Terms of Use', and 'Notice about third-party sites'. Below this, a banner for 'Version 2.41.1 (1 Nov 2009)' is visible. The main search area includes a search bar and a 'Search by' section with radio buttons for 'Keywords', 'Gene Symbol only', 'Symbol/alias', 'GC id', and 'Symbol/External id'. There are also options to 'Show microcards only', 'Show minicards also (slower)', 'Sort microcards alphabetically (faster)', and 'Sort microcards by relevance'. The page footer notes 'The GeneCards search is case insensitive'.

Figura 28. Página principal de GeneCard.

Con una búsqueda de un gen concreto (Figura 29), la página muestra información acerca del gen, la proteína codificada por dicho gen, la expresión del mismo, las funciones y rutas metabólicas en las que participa, así como enlaces directos a otras bases de datos.

Todos los genes estudiados fueron identificados en ésta página, determinándose de ese modo su localización cromosómica, así como la hebra en la que se encuentra codificado. Éste dato es muy importante para determinar la posición del polimorfismo, ya que generalmente las bases de datos proporcionan la secuencia de la hebra positiva (sentido 5' → 3').

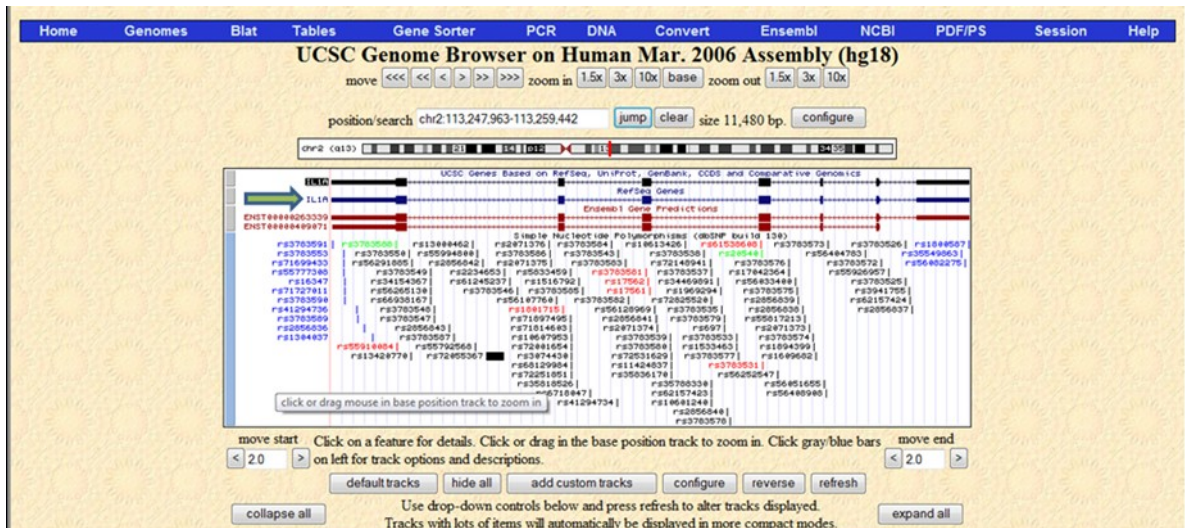
<p><b>Summaries for IL1A</b></p> <p>(According to <a href="#">Entrez Gene</a>, <a href="#">Wikipedia's Gene Wiki</a>, <a href="#">UniProtKB/Swiss-Prot</a>, and/or <a href="#">UniProtKB/TrEMBL</a>)</p> <p><a href="#">About This Section</a></p> <p>Jump to Section... ▾</p>	<p><b>EntrezGene summary for IL1A:</b></p> <p>The protein encoded by this gene is a member of the interleukin 1 cytokine family. This cytokine is a pleiotropic cytokine involved in various immune responses, inflammatory processes, and hematopoiesis. This cytokine is produced by monocytes and macrophages as a proprotein, which is proteolytically processed and released in response to cell injury, and thus induces apoptosis. This gene and eight other interleukin 1 family genes form a cytokine gene cluster on chromosome 2. It has been suggested that the polymorphism of these genes is associated with rheumatoid arthritis and Alzheimer's disease. [provided by RefSeq]</p> <p><b>UniProtKB/Swiss-Prot: IL1A_HUMAN_P01583</b></p> <p><b>Function:</b> Produced by activated macrophages, IL-1 stimulates thymocyte proliferation by inducing IL-2 release, B-cell maturation and proliferation, and fibroblast growth factor activity. IL-1 proteins are involved in the inflammatory response, being identified as endogenous pyrogens, and are reported to stimulate the release of prostaglandin and collagenase from synovial cells</p> <p><b>Gene Wiki entry for IL1A</b></p>
<p><b>Genomic Location for IL1A</b></p> <p>(According to <a href="#">GeneLoc</a>, and/or <a href="#">HGNC</a>, and/or <a href="#">Entrez Gene (UCB build 36)</a>, and/or <a href="#">miRBase</a>)</p> <p>Genomic Views according to <a href="#">UCSC</a> and <a href="#">Ensembl</a>. Transcription factor binding sites according to <a href="#">SABiosciences</a></p> <p><a href="#">About This Section</a></p> <p>Jump to Section... ▾</p>	<p><b>Genomic View:</b></p> <p><a href="#">UCSC Golden Path with GeneCards custom track</a></p> <p><b>SABiosciences</b> <a href="#">Transcription factor binding sites</a> upstream to the IL1A gene </p> <p>Entrez Gene cytogenetic band: <b>2q14</b> Ensembl cytogenetic band: <b>2q13</b> HGNC cytogenetic band: <b>2q14</b></p> <p>IL1A Gene in genomic location: bands according to <a href="#">Ensembl</a>, locations according to <a href="#">GeneLoc</a> (and/or <a href="#">Entrez Gene</a> and/or <a href="#">Ensembl</a> if different)</p>  <p><a href="#">GeneLoc gene densities for chromosome 2</a> <a href="#">GeneLoc Exon Structure</a></p> <p><a href="#">GeneLoc location for GC02M113247: (about GC identifiers)</a></p> <p>Start: 113,247,963 bp from pter End: 113,259,442 bp from pter Size: 11,480 bases Orientation: minus strand</p>

**Figura 29.** Resultado de la búsqueda del gen de IL-1A. Se muestra sólo una parte de la información que proporciona la página.

Además de determinar la ubicación física del gen, también se extrajo información del tamaño del mismo, así como detalles de su organización (número de exones, tipo de ajuste, isoformas funcionales).

**IDENTIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO**

Una vez descrito el gen, se procedió a la identificación molecular del polimorfismo. Para ello, el primer paso consistió en obtener la secuencia del gen, mediante la plataforma UCSC Genome browser, de la Universidad de California (EE.UU.) (<http://genome.ucsc.edu/index.html>) que contiene una base de datos de referencia de secuencias de genes y proteínas, tanto de humanos como de otros animales (figura 30).



**Figura 30.** Resultados de la búsqueda de *IL1A* en la página web Genome browser. En caso del gen de *IL1A*, se observa que se encuentra codificado en la hebra negativa, ya que las flechas que se representan en el gen van de derecha a izquierda de la figura. También se muestran, en la parte inferior de la figura, todos los polimorfismos descritos en el gen con su número de identificación del NCBI.

La búsqueda en esta página de un gen concreto proporciona información acerca de la localización cromosómica del gen, además de otros datos sobre la secuencia que pueden seleccionarse en un amplio menú. Además, posee una herramienta zoom que permite acercar o alejar la región genómica, de manera que se puede obtener información de las secuencias adyacentes al gen. Bajo el cromosoma se encuentra representado el gen de interés, así como la hebra en la que se encuentra codificada.

Para obtener la secuencia específica, se selecciona la línea que representa al gen (flecha verde en figura 30), lo que reenvía a una nueva página en la que se describe brevemente el gen, además de tener un enlace con la secuencia (figura 31), que permite seleccionar las características de la secuencia que se quiera descargar (figura 32).

**Human Gene IL1A (uc002tig.1) Description and Page Index**

**Description:** interleukin 1, alpha proprotein  
**RefSeq Summary (NM\_000575):** The protein encoded by this gene is a member of the interleukin 1 cytokine family. This cytokine is a pleiotropic cytokine involved in various immune responses, inflammatory processes, and hematopoiesis. This cytokine is produced by monocytes and macrophages as a proprotein, which is proteolytically processed and released in response to cell injury, and thus induces apoptosis. This gene and eight other interleukin 1 family genes form a cytokine gene cluster on chromosome 2. It has been suggested that the polymorphism of these genes is associated with rheumatoid arthritis and Alzheimer's disease. [provided by RefSeq]  
**Strand:** - **Genomic Size:** 11480 **Exon Count:** 7 **Coding Exon Count:** 6

<b>Page Index</b>	Sequence and Links	UniProtKB Comments	Genetic Associations	CTD	Microarray
RNA Structure	Protein Structure	Other Species	GO Annotations	mRNA Descriptions	Pathways
Other Names	Model Information	Methods			

**Sequence and Links to Tools and Databases**

Genomic Sequence (chr2:113,247,963-113,259,442)		mRNA (may differ from genome)		Protein (271 aa)	
Gene Sorter	Genome Browser	Protein FASTA	Proteome Browser	VisGene	Table Schema
CGAP	Ensembl	Entrez Gene	ExonPrimer	GeneCards	Gepis Tissue
H-INV	HGNC	HPRD	HuGE	Jackson Lab	OMIM
PubMed	SeattleSNPs PGA	Stanford SOURCE	Treefam	UniProtKB	User annotations

**Figura 31.** Pantalla con descripción breve del gen de interés, que permite la descarga directa de secuencias.

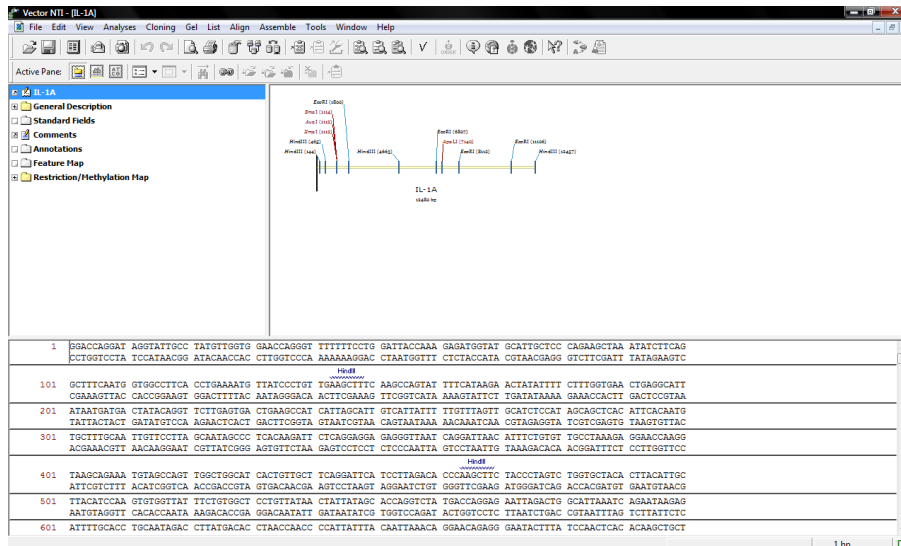
Es muy importante tener en cuenta la posible localización del polimorfismo de interés, ya que interesa tener completa la región génica en la que se encuentra el polimorfismo. Por ejemplo, el polimorfismo de *IL1A* que hemos estudiado se encuentra en posición -889, por lo que la secuencia que necesitamos debe contener al menos 900pb de la región promotora. Como se comentó anteriormente, debe tenerse muy en cuenta la hebra en que está codificada el gen, ya que generalmente las secuencias se anotan en sentido 5' → 3'. El gen que codifica la IL-1 $\alpha$  se encuentra en la hebra minus o inversa (*reverse*).

Una vez obtenida la secuencia, ésta fue introducida en el programa VectorNTI 10.3.0<sup>®</sup> 2006 Invitrogen Corporation, (Carlsbad, California, USA). Es un programa de análisis de secuencias que contiene una serie de herramientas de manejo que permite la creación de una base de datos de secuencias y el análisis de las mismas. Éste programa tiene multitud de aplicaciones, entre las que se encuentran el alineamiento de secuencias, diseño de oligonucleótidos, simulación de geles y selección de vectores de clonación, entre otras. En este estudio se ha utilizado su base de datos para representar la secuencia de interés (figura 32).

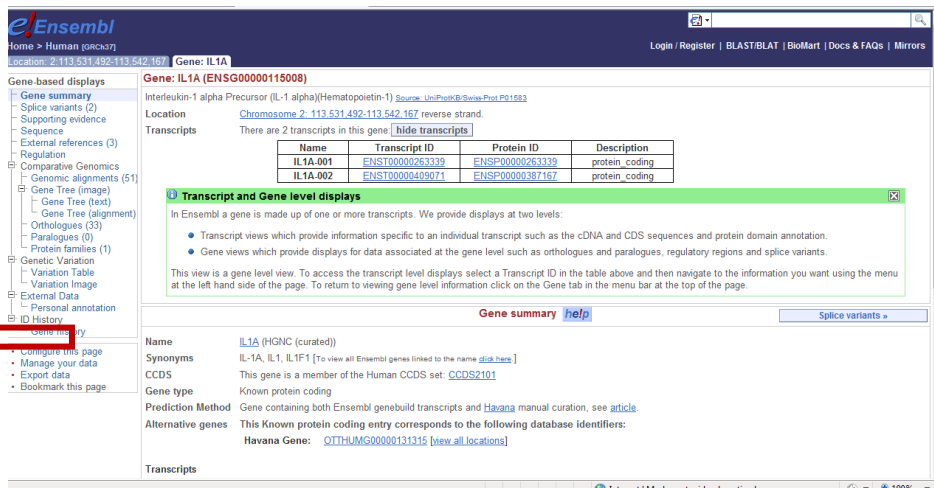
**Figura 32.** Pantalla para la selección de las características de la secuencia.

Posteriormente se identificaron los oligonucleótidos capaces de amplificar el polimorfismo problema. Para ello se buscó en la base de datos del Instituto de Salud Americano (U.S. National Library of Medicine; PubMed) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

Finalmente, para determinar el rs, o número de identificación NCBI del polimorfismo, se visitó la página web: <http://www.ensembl.org/index.html>, una base de datos de genes y proteínas de humanos y otros animales creada por un proyecto entre EMBL - EBI (European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute) y Wellcome Trust Sanger Institute (Reino Unido) que posee un buscador que permite encontrar gran cantidad de información acerca del gen de interés (Figura 34).

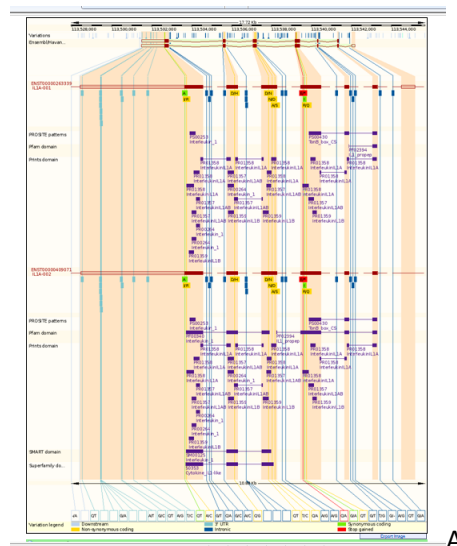


**Figura 33.** Visor del Vector NTI, en la parte superior derecha se muestra una representación grafica de la secuencia del gen que codifica IL-1 $\alpha$ , incluyendo los sitios de restricción. En la parte inferior se observa la secuencia.

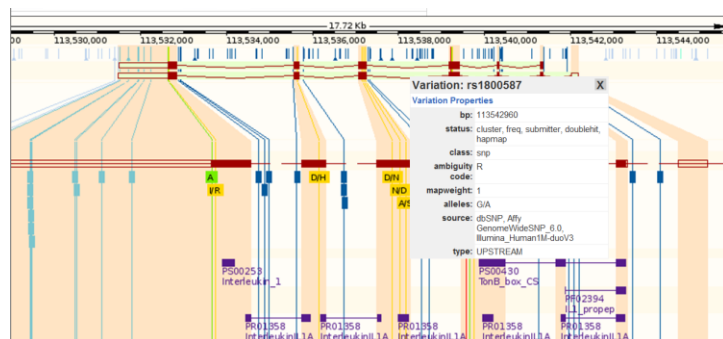


**Figura 34.** Página de resultados de Ensembl.

A la derecha de la página hay un diagrama desplegable en el que se puede seleccionar la opción “*variation image*” (recuadrada en la figura 34) y la base de datos nos muestra una representación gráfica del gen (Figura 35.A).



A



B

**Figura 35. A** En la parte inferior de la figura se muestra una leyenda explicativa de las regiones génicas representadas. En este ejemplo, para el polimorfismo -899 T/C de *IL1A*, que está en la región promotora (sentido 3'), representada a la derecha del gen, debido a que éste se encuentra codificado en la hebra reversa. En la parte superior derecha de la página, representada en la figura 32.B se seleccionan una a una las variantes representadas hasta encontrar la deseada.

Una vez representado, se identificó la región la que está descrito el polimorfismo de interés y se fueron analizando una a una las variaciones descritas en la secuencia (Figura 35.B). Dicho análisis se realizó introduciendo el número de identificación (rs) en la base de datos de SNP del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Snp>). En ésta página (Figura 36) aparece información muy diversa acerca del polimorfismo, en concreto la secuencia circundante al mismo, que se introdujo en el VectorNTI para su comprobación, además de las

frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo en distintas poblaciones. Dispone, así mismo, de un enlace a Medline. Tras su localización se anotó en el VectorNTI y se archivó en la base de datos (Figura 31).

**Reference SNP(rs) Cluster Report: rs1800587**

RefSNP	Allele	HGVS Names
rs1800587	C/T	NC_008555.1:g.50120>T NM_006575.3:c.945C>T NT_022135.1:g.2250363>A

NCBI Assay ID	Handle	Submitter ID	Validation Status	ss to rs Orientation	Alleles	5' Near Seq 30 bp	3' Near Seq 30 bp	Entry Date	Update Date	Build Added	Molecule Type	Flag
ss2420995	HGBASE	SNP00000482		fwdB	C/T	ctttaaataatgtaaccaggcaaca	catgaaggctcatatgtaaaaaatc	11/07/00	10/10/03	89	Genomic	
ss4045531	SC_LJM03833	L_549		fwdB	C/T	aaatctttaaataatgtaaccaggcaaca	catgaaggctcatatgtaaaaaatc	09/26/01	10/10/03	100	Genomic	
ss4395878	PGA-LJM03833	L_005138		fwdB	C/T	aaatctttaaataatgtaaccaggcaaca	catgaaggctcatatgtaaaaaatc	08/09/02	04/07/04	108	Genomic	
ss5888047	SNP000CANCER	IL1A-02		fwdB	C/T	aaatctttaaataatgtaaccaggcaaca	catgaaggctcatatgtaaaaaatc	09/26/02	04/07/04	113	Genomic	
ss11488152	WI_SSAHASNP	chr2:NT_022135.1:2250703		revT	A/G	gcattggattttacatagagccttcaaatg	tgtgacctggttactattataaagaatt	07/03/03	10/25/06	119	Genomic	
ss11885142c	CSHL-H4919AP	CSHL-H4919A:20452 chr2:NT_022135.1:2250703		revT	A/G	gcattggattttacatagagccttcaaatg	tgtgacctggttactattataaagaatt	02/17/04	03/04/04	120	Genomic	
ss23203315	PERLEGENI	af1298281		revT	A/G	gcattggattttacatagagccttcaaatg	tgtgacctggttactattataaagaatt	08/10/04	09/13/04	123	Genomic	
ss28514845	JDRF_WT	DIIDIL5307		revT	A/G	gcattggattttacatagagccttcaaatg	tgtgacctggttactattataaagaatt	09/07/04	09/07/04	128	Genomic	
ss44170580	ABIINC	V3545481		revT	A/G	gcattggattttacatagagccttcaaatg	tgtgacctggttactattataaagaatt	07/18/05	11/03/06	129	Genomic	
ss21833882	STEJUSTINE	REGOENI843_913		fwdB	C/T	aaatctttaaataatgtaaccaggcaaca	catgaaggctcatatgtaaaaaatc	02/16/06	02/16/06	129	Genomic	
ss25723141	ILLUMINA	Human1-rg1800587		fwdB	C/T	aaatctttaaataatgtaaccaggcaaca	catgaaggctcatatgtaaaaaatc	10/10/06	10/10/06	127	Genomic	
ss274871398	ILLUMINA	ILMN_Human_1M_11803587		fwdB	C/T	aaatctttaaataatgtaaccaggcaaca	catgaaggctcatatgtaaaaaatc	06/29/07	06/29/07	129	Genomic	
ss178525925	AFFY	JAFFY_8_1M_SNP_A-8485979		fwdB	C/T	taataaccaacaaca	catgaaggctcatatgtaaaaaatc	06/29/07	06/30/07	129	Genomic	

**Ilustración 36.** Búsqueda de un polimorfismo en NCBI-SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Snp>)

### 4.3 ESTUDIO ESTADÍSTICO DE ASOCIACIÓN GENÉTICA ENTRE CASOS Y CONTROLES

#### ANÁLISIS DESCRIPTIVO

El análisis descriptivo de la población estudiada se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS 17.0 (IBM, Chicago, Illinois). Las variables cualitativas fueron descritas en función de proporciones en los diferentes grupos, mientras que el análisis de variables cuantitativas se llevó a cabo utilizando medidas de tendencia central (media o mediana en función de las características de la variable).



## ANÁLISIS BIVARIANTE Y MULTIVARIANTE

Se llevó a cabo un análisis estadístico comparando la distribución de los diferentes polimorfismos entre controles y pacientes en función de sus características fenotípicas, con el fin de determinar una posible asociación. Las diferencias se establecieron a partir de un nivel de significación de  $p$ -Fisher  $< 0,05$ . El OR se expresó en todos los casos con un intervalo de confianza del 95%. Teniendo en cuenta los posibles sesgos de comparaciones múltiples mediante la corrección de Bonferroni. En todos los casos en que se encontró asociación significativa se llevó a cabo una regresión logística binaria utilizando el paquete estadístico SPSS 17.0 (IBM, Chicago, Illinois), ajustando por edad y sexo, con el fin de determinar la posible influencia de estas dos variables en la significación encontrada. Para estimar el riesgo derivado de las diferencias significativas se calculó la *Odds Ratio* (OR) con intervalo de confianza al 95%. Además se calculó el poder estadístico de la asociación encontrada, utilizando la plataforma on-line <http://statpages.org/proppowr.html> (Statistical Methods for Rates and Proportions por Joseph L. Fleiss (Segunda Edición., 1981, John Wiley & Sons, NY), capítulo 3). Se realizó un primer análisis del poder estadístico para el cálculo del tamaño muestral inicial y se realizó un segundo análisis del poder estadístico sobre los resultados obtenidos. En los casos significativos, se determinó, además, la probabilidad de obtener un resultado falso positivo (FPRP) utilizando el método descrito por Wacholder y colaboradores [265].

## COMPARACIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS

Con el objetivo de establecer posibles diferencias en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas entre controles y los distintos grupos clínicos, se realizó la comparación de dichas frecuencias mediante un test de contingencia tipo  $\chi^2$ . Se realizó también el análisis del equilibrio de Hardy-Weimberg mediante una prueba  $\chi^2$ .

Estas comparaciones se llevaron a cabo utilizando la plataforma estadística on-line SHEsis [266] (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>).

## ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS Y DIPLIOTIPOS

Un haplotipo (del griego *aplóos*, simple y *typos* huella) se define como la constitución genética de un cromosoma individual, o lo que es lo mismo, el conjunto de los genes contenidos en uno solo de los cromosomas de un par, mientras que un diplotipo es la pareja de haplotipos de un individuo determinado.

En este estudio se ha determinado la asociación de los haplotipos y diplotipos de los genes *TNFA*, *TGFB*, *IL4*, *IL2*, *IL6* e *IL10* con las diferentes características clínicas de los pacientes. Para ello se han utilizado diferentes herramientas estadísticas:

- Plataforma estadística on-line SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>): empleada en la comparación de la frecuencia de los diferentes haplotipos entre controles y pacientes [267].
- *SNP analyzer* ([http://www.istech.info/istech/board/login\\_form.josp](http://www.istech.info/istech/board/login_form.josp)): utilizado para deducir diplotipos teóricos según los algoritmos *Clark*, *EM* y el *Pseudo Gibbs Sampler algorithm* (PGS) [268], con el fin de comparar la bondad de la estimación con respecto a los diplotipos reales.
- SPSS 17.0 (IBM, Chicago, Illinois): se utilizó para: Determinar la posible influencia de la presencia de un diplotipo determinado en la patología; Determinar el modelo de herencia, es decir, determinar si la presencia de un determinado haplotipo influye en alguna característica clínica de forma dominante o recesiva.

## ANÁLISIS DE COMBINACIONES GÉNICAS

El análisis de la combinación de los diferentes polimorfismos en función de la patología se llevó a cabo utilizando el software “Multifactorial Dimensional Reduction: MDR”, disponible en <http://www.multifactordimensionalityreduction.org/>. Este programa utiliza una estrategia de detección y caracterización no lineal entre atributos discretos (en este caso polimorfismos) con patrones característicos en función de características clínicas [269]. En primer lugar se llevó a cabo un análisis de permutaciones con la aplicación “mdrpt”, determinando las combinaciones más estadísticamente más significativas, y posteriormente se determinó la distribución de dichas combinaciones, mediante la aplicación “mdr”.



# RESULTADOS

---





## **5. RESULTADOS**

En este estudio se han analizado un total de 376 individuos, en los que se han caracterizado 162 variables tanto fenotípicas como genotípicas, por lo que en total se han analizado 64.672 datos.

### ***5.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA UNIVARIANTE***

#### **DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN CONTROL**

Se han incluido un total de 157 individuos en el grupo control, previo cálculo predictivo de tamaño muestral basado en el poder estadístico y tras estricta evaluación clínica por parte de un Facultativo del Servicio de Inmunoalergia del hospital Universitario de Salamanca.

La mediana de edad del grupo control es de 50 años (R.I.= 33) (Figura 37), con cierto predominio del sexo femenino (63,1%, 99 mujeres frente a 58 hombres) (Figura 38).

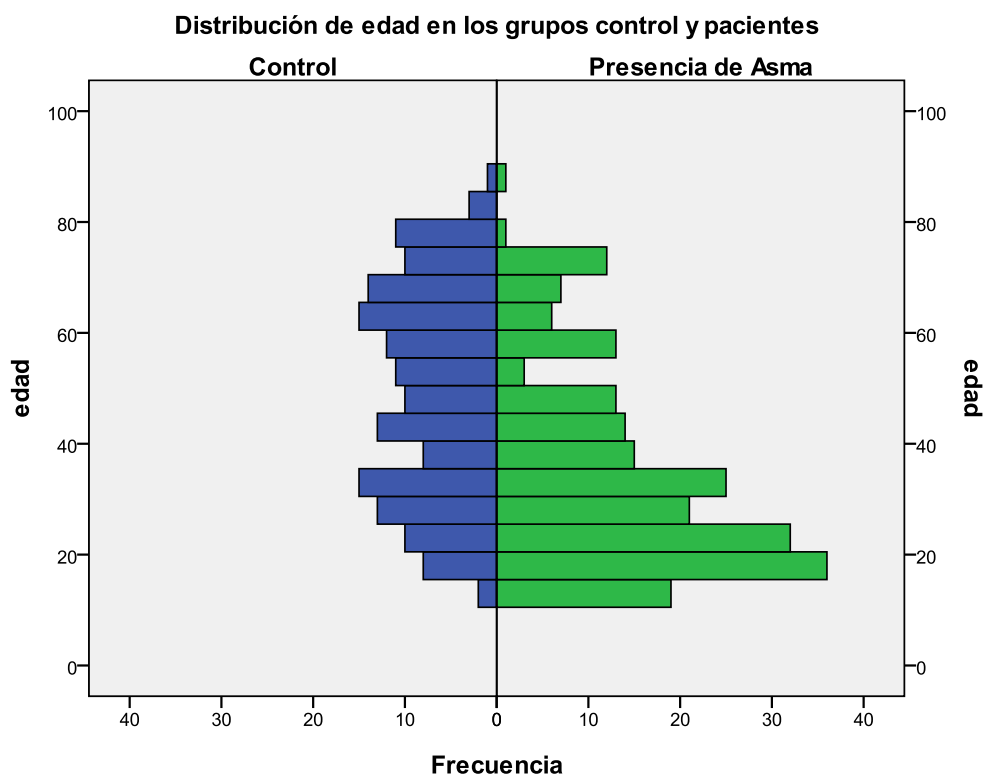
Todos los individuos incluidos en la población control carecían de síntomas o antecedentes familiares de enfermedades alérgicas o respiratorias. Se obtuvieron unos niveles medios de IgE de 91,57 (D.E.: 175,85).

#### **DESCRIPCIÓN DE LOS PACIENTES**

El estudio incluyó un total de 219 pacientes con diagnóstico clínico de asma de acuerdo con los criterios de la GINA. La mediana de edad de los mismos fue de 31 años (R.I.= 26) (Figura 37), con cierto predominio del sexo femenino (60,3%) al igual que en la población control (Figura 38).

#### ***ANTECEDENTES PERSONALES***

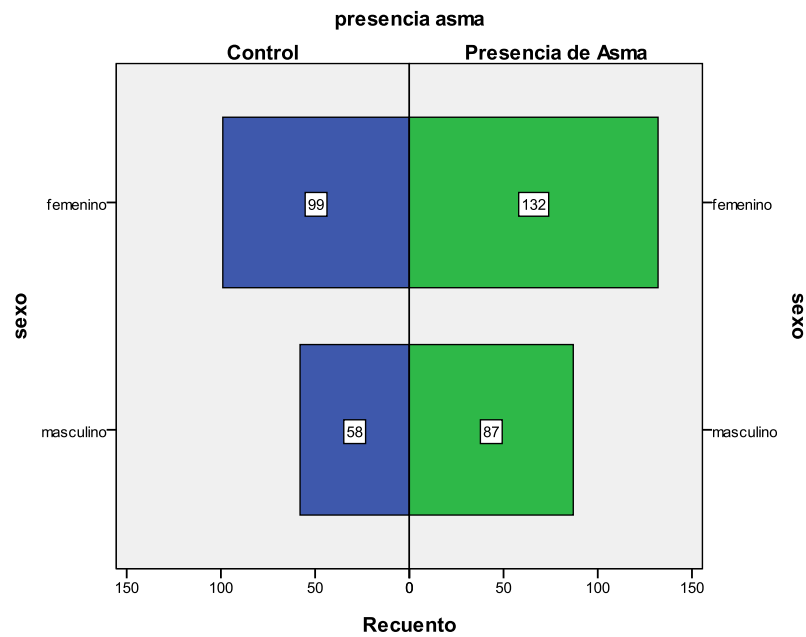
Un 78,4% de los pacientes (172) presentó pruebas cutáneas positivas frente a algún aeroalérgeno de la batería de alérgenos comunes utilizada en el estudio. Las pruebas cutáneas positivas registradas se muestran en la tabla 6. La sensibilidad conjunta a ácaros y pólenes se tuvo en cuenta debido a la gran representatividad en los pacientes con ambas sensibilidades.



**Figura 37.** Distribución por edades de los individuos del grupo control y con asma

En todos los individuos se valoró la gravedad del asma según los criterios de la GINA, encontrándose una distribución en las diferentes categorías que se muestra en la figura 39. Otras variables clínicas recogidas en los pacientes se detallan a continuación: un 42,5% de los pacientes había seguido tratamiento con inmunoterapia; un 13,2% de los mismos presentaba poliposis; el 13,7% mostró intolerancia a los antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Un 6,4% de pacientes sufría tríada de la aspirina, caracterizada por asma, poliposis e intolerancia a los AINE.





**Figura 38.** Distribución de sexos en la población control y con asma

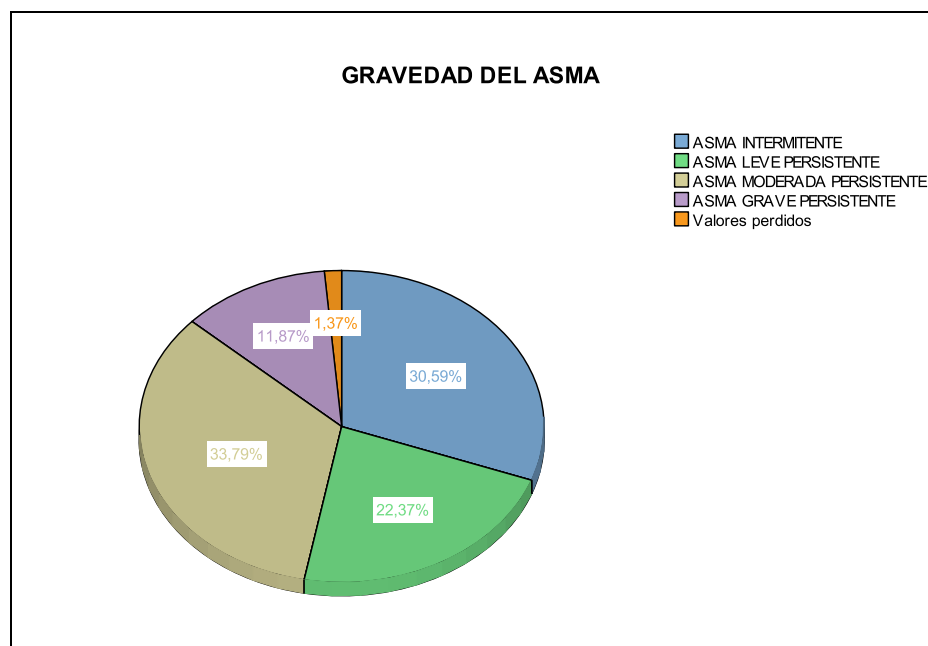
**Tabla 6.** Distribución de las pruebas cutáneas en los pacientes con asma atópica. Los porcentajes están referidos al total de pacientes con pruebas cutáneas positivas.

AEROALÉRGENO	PRUEBAS POSITIVAS (%)
<b>ÁCAROS</b>	48,8
<b>PÓLENES</b>	62,2
<b>HONGOS</b>	8,7
<b>EPITELIOS</b>	23,3
<b>ÁCAROS Y PÓLENES</b>	25,6
<b>POLISENSIBILIZADOS</b>	43

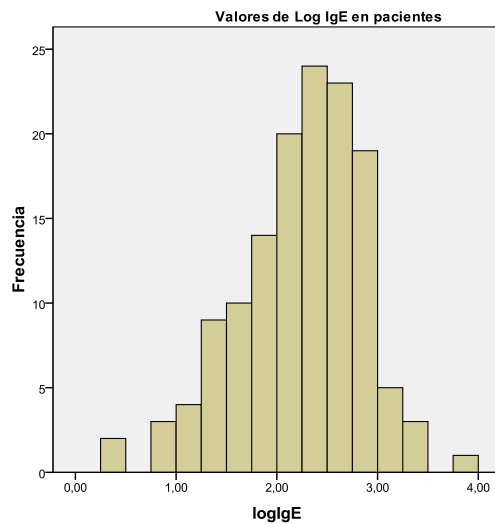
**ANTECEDENTES FAMILIARES**

En la tabla 7 se muestra la distribución de los antecedentes familiares de asma y atopia en la población de pacientes.

Las muestras de la población CEU de HapMap que se presentan en la tabla 8, se obtuvieron a partir de habitantes de Utah (EE.UU) con antepasados procedentes Europa del Norte y Occidental. Los individuos recogidos en la población de Utah no comparten los criterios de los individuos control de nuestra población.



**Figura 39.** Distribución de la gravedad del asma en los pacientes.



**Figura 40.** Distribución de los valores de niveles de IgE en pacientes (expresado en logaritmo en base 10)

**Tabla 7.** Distribución de la presencia de antecedentes familiares de asma y atopia en la población de pacientes.

	ANTECEDENTES FAMILIARES DE ASMA	ANTECEDENTES FAMILIARES DE ATOPIA
<b>PRESENCIA</b>	40,2%	42%
<b>AUSENCIA</b>	58,4%	56,1%
<b>DESCONOCIDOS</b>	1,4%	1,9%

## **DISTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN LA POBLACIÓN CONTROL**

En la tabla 8 se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas en el análisis de los diferentes polimorfismos. Se muestran también las frecuencias de una población de referencia (CEPH -*Utah residents with ancestry from Northern and Western Europe*-CEU).

### **5.2 ESTUDIO BIVARIANTE Y MULTIVARIANTE DE POLIMORFISMOS**

#### **ASMA**

Al analizar el conjunto de polimorfismos entre pacientes con asma y controles, se ha encontrado diferencias estadísticamente significativas ( $p$ -Fisher  $<0,05$ ) en los polimorfismos, *IL2* 166, *IL6* -174, *IL6* nt565, *IL12* -1188 y *TNFA* -308 (Tabla 9).

**Tabla 8.** Distribución de frecuencias alélicas en población nuestra población y en la población CEU

GEN	IL1a	IL-1B	IL-1B	IL-1R1	IL-1RN	IL-2	IL-2	IL-4	IL-4	IL-4	IL-4R
<b>Cambio</b>	-889C>T	-511 C>T	3962 C>T	pstI A C>T	MspI pos 30,735 T>C	-330 T>G	166 G>T	-1098 T>G	-589 C>T	-33 C>T	1092 A>G
<b>Rs</b>	1800587	16944	1143634	2234650	315952	2069762	2069763	2243248	2243250	2070874	1801275
<b>CONTROLES</b>	T: 0	T: 0,299	T: 0,168	T: 0,329	C: 0,242	G: 0,319	T: 0,285	G: 0,682	T: 0,143	T: 0,145	G: 0,234
<b>CEU</b>	T: 0,308	T: 0,345	T: 0,223	T: 0,264	C: 0,258	G: 0,232	T: 0,342	G: 0,092	T: 0,164	T: 0,158	G: 0,225
GEN	IL-6	IL-6	IL-10	IL-10	IL-10	IL 12B	IFN-G	TGFB-1	TGFB-1 Pob CAUC1 SNP 500CANCER	TNF-A	TNF-A
<b>cambio</b>	-174 G>C	nt565G>A	-592 C>A	-819 C>T	-1082 A>G	-1188 A>C	74 A>T	c10 T>C	c25 G>C	-238 G>A	-308 G>A
<b>rs</b>	1800795	1800797	1800872	1800871	1800896	3212227	2430561	1982073	1800471	361525	1800629
<b>CONTROLES</b>	C: 0,377	A: 0,366	A: 0,309	T: 0,327	G: 0,330	C: 0,169	T: 0,353	C: 0,412	C: 0,122	A: 0,076	A: 0,062
<b>CEU</b>	C: 0,533	A: 0,481	A: 0,202	T: 0,173	G: 0,533	C: 0,225	T: 0,542	C: 0	C: 0,113	A: 0,074	A: 0,217

**Tabla 9.** Estudio comparativo en las frecuencias alélicas y genotípicas de los controles y pacientes con asma mediante P de Fisher.

SNP	p-Fisher (Alélica)	p-Fisher (Genotípica)	SNP	p-Fisher (Alélica)	p-Fisher (Genotípica)
<b><i>IL1R</i> pst1 1970</b>	0,95	0,84	<b><i>TGFB1</i> c25</b>	0,52	0,84
<b><i>IL1B</i> 3962</b>	0,11	0,26	<b><i>IL4</i> -1098</b>	0,74	0,37
<b><i>IL1B</i> -511</b>	0,78	0,96	<b><i>IL4</i> -590</b>	0,75	0,28
<b><i>IL1A</i> -889</b>	0,23	0,39	<b><i>IL4</i> -33</b>	0,84	0,67
<b><i>IFNG</i> 874</b>	0,89	0,85	<b><i>IL2</i> -330</b>	0,77	0,94
<b><i>IL12</i> -1188</b>	<b>0,017*</b>	<b>0,023*</b>	<b><i>IL2</i> 166</b>	<b>0,040*</b>	0,11
<b><i>IL4RA</i> -1902</b>	0,20	0,44	<b><i>IL6</i> -174</b>	<b>0,040*</b>	0,12
<b><i>IL1RA</i> 1110</b>	0,69	0,66	<b><i>IL6</i> nt565</b>	<b>0,033*</b>	0,09
<b><i>TNFA</i> -308</b>	<b>0,021*</b>	0,06	<b><i>IL10</i> -1082</b>	0,22	0,48
<b><i>TNFA</i> -238</b>	0,30	0,52	<b><i>IL10</i> -819</b>	0,60	0,20
<b><i>TGFB1</i> c10</b>	0,954	0,474	<b><i>IL10</i> -592</b>	0,784	0,79

\*p-Fisher < 0,05

En este estudio, encontramos que el alelo C del polimorfismo en posición -1188 del gen de la *IL12B* fue más frecuente en los pacientes con asma (25%) que en controles (17%) con una p=0,017 (OR: 1,61; IC 95%: 1,09 - 2,37). Con respecto a las frecuencias genotípicas, se

observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p= 0,023$ ) en el genotipo AC, siendo más frecuente en los pacientes (39%) que en los controles (25%), lo que fue confirmado mediante regresión logística al ajustar por edad y sexo,  $p=0,029$ ; OR: 2,00 (1,08 - 6,73),

El alelo A en posición -308 del *TNFA* se observó con más frecuencia en los pacientes con asma (11,2%) que en los controles (6,2%), con una  $p = 0,021$ , OR: 1,89 (1,09-3,29). No se observaron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas.

En el estudio del polimorfismo en posición 166 del gen *IL2*, el alelo T resultó ser más frecuente en los pacientes (36%) que en los controles (28,5%), con una  $p = 0,039$ ; OR: 1,12 (1,01-1,24).

En el polimorfismo en posición -174 del gen de la *IL-6* se observó una frecuencia mayor del alelo C en los controles (37,7% frente al 30,2% en los casos) con una  $p = 0,039$ ; OR: 0,71 (0,52-0,98). No se observaron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas.

El alelo A del polimorfismo *IL 6 nt565* se encontró en mayor proporción en los controles (36,6%) que en los pacientes (28,9%) con una  $p= 0,033$ ; OR: 0,70 (0,51 - 0,97). Tampoco se encontraron diferencias significativas en el estudio de las frecuencias genotípicas.

## **POLIMORFISMOS ASOCIADOS AL ASMA ATÓPICA**

Al analizar el conjunto de polimorfismos entre pacientes con asma atópica y controles, se ha encontrado diferencias estadísticamente significativas ( $p$ -Fisher  $<0,05$ ) en los polimorfismos *IL 1B 3962*, *IL 12 -1188*, *TNFA -308* y *IL 2 166* (Tabla 10).

**Tabla 10.** Estudio comparativo en las frecuencias alélicas y genotípicas de los controles y pacientes con asma atópica mediante P de Fisher

SNP	p-Fisher (Alélica)	p-Fisher (Genotípica)	SNP	p-Fisher (Alélica)	p-Fisher (Genotípica)
<b><i>IL1R</i> pst1 1970</b>	0,44	0,52	<b><i>TGFB1</i> c25</b>	0,93	0,99
<b><i>IL1B</i> 3962</b>	<b>0,031*</b>	0,11	<b><i>IL4</i> -1098</b>	0,37	0,55
<b><i>IL1B</i> -511</b>	0,99	0,99	<b><i>IL4</i> -590</b>	0,81	0,27
<b><i>IL1A</i> -889</b>	0,99	0,34	<b><i>IL4</i> -33</b>	0,80	0,68
<b><i>IFNG</i> 874</b>	0,61	0,75	<b><i>IL2</i> -330</b>	0,22	0,38
<b><i>IL12</i> -1188</b>	<b>0,019*</b>	<b>0,038*</b>	<b><i>IL2</i> 166</b>	<b>0,019*</b>	0,05
<b><i>IL4RA</i> -1902</b>	0,37	0,46	<b><i>IL6</i> -174</b>	0,09	0,24
<b><i>IL1RA</i>1110</b>	0,42	0,52	<b><i>IL6</i> nt565</b>	0,10	0,24
<b><i>TNFA</i> -308</b>	<b>0,031*</b>	0,11	<b><i>IL10</i> -1082</b>	0,13	0,32
<b><i>TNFA</i> -238</b>	0,17	0,39	<b><i>IL10</i> -819</b>	0,53	0,39
<b><i>TGFB1</i> c10</b>	0,95	0,53	<b><i>IL10</i> -592</b>	0,93	0,99

\*p-Fisher < 0,05

El análisis del polimorfismo en posición 3962 del gen de la *IL1B* mostró diferencias significativas en la frecuencia del alelo T en pacientes con asma atópica (24,2% frente al 17,8% en controles), con una  $p= 0,032$ ; OR: 1,58 (1,40 - 2,40). No se encontraron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas.

En el caso del SNP en posición -1188 del gen *IL 12B*, de nuevo se encontró el alelo C con mayor frecuencia en los pacientes (24,8%) que en los controles (16,9%) con una  $p= 0,018$ ; OR : 1,62 (1, 08 – 2,44). En el análisis de las frecuencias genotípicas reflejó una mayor



proporción del genotipo AC en los pacientes (38,1%) que en los controles (25,2%) ( $p= 0,38$ ). Sin embargo, al ajustar por edad y por sexo, esta asociación no se confirmó.

El análisis del gen de *TNFA* reflejó también una mayor frecuencia del alelo A en posición -308 en los pacientes (11% frente a un 6,2% en controles), con una  $p = 0,031$ ; OR: 1,869 (1,05 - 3,37).

Finalmente, el alelo T del polimorfismo en posición 166 del gen de *IL2* se encontró en mayor proporción en los pacientes (37,5%) que en los controles (28,5%) con una  $p = 0,019$ ; OR: 1,51 (1,07 – 2,13).

## **ASMA NO ATÓPICA**

Al analizar el conjunto de polimorfismos en los pacientes con asma no atópica , se han observado diferencias estadísticamente significativas en los polimorfismos *TNFA* -308, *IL2* -330, *IL6* -174 e *IL6* nt565 (Tabla 11).

Se encontraron diferencias significativas en las frecuencias del genotipo GA en posición -308 de *TNFA*, que resultó más frecuente en los pacientes (29,9%) que en los controles (9,9%), con una  $p= 0,042$ . Al ajustar por edad y sexo para determinar la posible influencia de las variables en la significación descrita, encontramos que se mantiene la significación, con una  $p= 0,021$  y un OR de 2,75 (1,16 – 6,50). Además, se encontraron diferencias significativas en la frecuencia del alelo G del polimorfismo *IL2* -330, más abundante en los casos (45%) que en los controles (31,9%), con una  $p$  de Fisher de 0,030 y una OR de 1,743 (1,05 – 2,89). Por último, para el gen *IL6*, el alelo C del polimorfismo en posición -174 resultó ser más frecuente en los controles (37,7% ) que en los pacientes (25,6%), con una significación  $p= 0,049$ ; OR : 0,57 (0,33 – 1,00), y en el polimorfismo nt565 de *IL 6* se encontraron diferencias significativas en la

frecuencia del alelo A, más abundante en los controles (36,6%) que en los pacientes (23,1%), con una  $p = 0,025$ ; OR: 0,52 (0,29 – 0,923).

**Tabla 11.** Estudio comparativo en las frecuencias alélicas y genotípicas de los controles y pacientes con asma no atópica mediante P de Fisher

SNP	p-Fisher (Alélica)	p-Fisher (Genotípica)	SNP	p-Fisher (Alélica)	p-Fisher (Genotípica)
<i>IL1R pst1 1970</i>	0,08	0,15	<i>TGFB1 c25</i>	0,06	0,24
<i>IL1B 3962</i>	0,52	0,82	<i>IL4 -1098</i>	0,28	0,10
<i>IL1B -511</i>	0,49	0,75	<i>IL4 -590</i>	0,73	0,76
<i>IL1A -889</i>	-	-	<i>IL4 -33</i>	0,98	0,89
<i>G IFN 874</i>	0,46	0,80	<i>IL2 -330</i>	<b>0,030*</b>	0,05
<i>IL12 -1188</i>	0,16	0,10	<i>IL2 166</i>	0,79	0,93
<i>IL4RA-1902</i>	0,13	0,15	<i>IL6 -174</i>	<b>0,049*</b>	0,14
<i>IL1RA1110</i>	0,42	0,69	<i>IL6 nt565</i>	<b>0,03*</b>	0,09
<i>TNFA -308</i>	0,08	<b>0,04*</b>	<i>IL10 -1082</i>	0,89	0,96
<i>TNFA -238</i>	0,70	0,44	<i>IL10 -819</i>	0,99	0,15
<i>TGFB1 c10</i>	0,75	0,67	<i>IL10 -592</i>	0,76	0,26

\*p-Fisher < 0, 05

## ANTECEDENTES FAMILIARES DE ASMA O ENFERMEDADES ALÉRGICAS

Al analizar el conjunto de polimorfismos entre pacientes con antecedentes familiares de asma y/o atopia y controles, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas ( $p$ -Fisher  $<0,05$ ) en los polimorfismos *IL12B* -1188, *TNFA* -308, *TGFB1* c25, *IL2* 166, *IL6* -174 e *IL6* nt565, que se muestran en la tabla 12.

**Tabla 12.** Estudio comparativo en las frecuencias alélicas y genotípicas de los controles y pacientes con antecedentes familiares de asma y/o atopia mediante P de Fisher.

		A. F. ASMA	A. F. ATOPIA	A.F. ASMA Y ATOPIA	A. F. ASMA O ATOPIA
<b><i>IL12 -1188</i></b>	P-Alélica	<b>0,037*</b>	<b>0,028*</b>	0,32	<b>0,024*</b>
	P-Genotípica	0,14	0,09	0,41	<b>0,047*</b>
<b><i>TNFA -308</i></b>	P-Alélica	<b>0,038*</b>	0,27	0,11	0,09
	P-Genotípica	0,12	0,41	0,24	0,20
<b><i>TGFB1 c25</i></b>	P-Alélica	0,28	0,14	<b>0,040*</b>	0,28
	P-Genotípica	0,27	0,42	0,17	0,47
<b><i>IL2 166</i></b>	P-Alélica	<b>0,017*</b>	0,15	<b>0,037*</b>	0,06
	P-Genotípica	<b>0,028*</b>	0,31	0,10	0,10
<b><i>IL6 nt565</i></b>	P-Alélica	0,17	<b>0,049*</b>	0,15	0,10
	P-Genotípica	0,33	0,14	0,36	0,27

\* $p$ -Fisher  $< 0,05$

Se observó una asociación con los antecedentes familiares de asma para los SNP en posiciones -1288 de *IL12B*, -308 de *TNFA*, y 166 de *IL2*. En concreto se encontró asociación del polimorfismo *IL2* 166 con las variables “antecedentes familiares de asma” y “antecedentes

familiares de asma y atopia". En ambos casos, se encontró una mayor frecuencia del alelo mutado T en pacientes con respecto a controles: 39,6% vs 28,5% en individuos con antecedentes familiares de asma,  $p = 0,017$ , OR: 1,65 (1,09 – 2,49); 39,3% vs 28,5% en el caso de los individuos con antecedentes familiares de asma y atopia, con una  $p = 0,037$ , OR de 1,61 (1,03 – 2,57). En el análisis de frecuencias genotípicas se observaron diferencias significativas en el genotipo TT, significativamente más frecuente en el grupo de pacientes con antecedentes familiares de asma (19,5% vs 7,6% en controles), con  $p = 0,028$ . Esta asociación no se confirmó al ajustar por edad y sexo.

En el caso de los antecedentes de atopia se observó asociación con los SNP nt565 del gen de *IL6* y -1188 de *IL12B*. En este último caso, al analizar la distribución alélica en los individuos con antecedentes familiares de atopia se encontró una mayor proporción del alelo C en pacientes (25,6%) que en controles (16,9%), con una  $p = 0,028$ ; OR: 1,692 (1,06 – 2,71). Este resultado coincide con el que se obtiene al comparar las frecuencias alélicas entre controles e individuos con algún tipo de antecedente familiar de asma o atopia, donde el alelo C se encontró con mayor frecuencia en pacientes (25,2%) que en controles (16,9%) con una  $p=0,024$ ; OR: 1,659 (1,07 – 2,58).

## **SENSIBILIZACIÓN ALÉRGICA**

En el análisis de los pacientes con sensibilización alérgica se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p$  de Fisher  $<0,05$ ) en los polimorfismos que se muestran en la tabla 13.

El alelo T del polimorfismo *IL1B 3962* resultó ser más abundante en los pacientes sensibilizados a pólenes (24,5%) que en los controles (16,8%) con una  $p= 0,045$ ; OR: 1,605 (1,01 – 2,55).

**Tabla 13.** Estudio comparativo en las frecuencias alélicas y genotípicas de los controles y pacientes con sensibilización alérgica mediante P de Fisher.

	p-Fisher	ÁCAROS	PÓLENES	ÁCAROS Y PÓLENES	EPITELIOS	HONGOS	MAS DE UN ALÉRGENO
<b>IL1B</b>	Alélica	0,162	<b>0,045*</b>	0,207	0,216	0,615	0,068
<b>3962</b>	Genotípica	0,077	0,107	0,103	<b>0,030*</b>	0,077	<b>0,028*</b>
<b>IL12-</b>	Alélica	<b>0,007*</b>	0,105	0,081	0,091	0,625	<b>0,023*</b>
<b>1188</b>	Genotípica	<b>0,013*</b>	0,063	<b>0,040*</b>	0,276	0,816	<b>0,049*</b>
<b>IL1RN</b>	Alélica	0,365	0,694	0,628	0,789	<b>0,022*</b>	0,670
<b>MspI</b>	Genotípica	0,274	0,507	0,256	0,956	<b>0,043*</b>	0,357
<b>TNFA</b>	Alélica	<b>0,008*</b>	<b>0,035*</b>	<b>0,002*</b>	0,189	0,921	<b>0,003*</b>
<b>-308</b>	Genotípica	0,058	0,137	0,018*	0,306	0,830	<b>0,028*</b>
<b>TNFA</b>	Alélica	0,301	0,068	0,320	<b>0,027*</b>	0,086	0,082
<b>-238</b>	Genotípica	0,591	0,182	0,516	0,091	0,095	0,209
<b>TGFB1</b>	Alélica	0,799	0,309	0,091	0,361	0,209	0,808
<b>c10</b>	Genotípica	0,928	0,266	0,203	<b>0,048*</b>	0,257	0,595
<b>IL2 -</b>	Alélica	0,733	0,067	0,272	<b>0,049*</b>	0,889	0,091
<b>330</b>	Genotípica	0,299	0,136	0,0912	0,123	0,893	0,146
<b>IL2</b>	Alélica	0,073	<b>0,014*</b>	<b>0,042*</b>	0,061	0,349	<b>0,048*</b>
<b>166</b>	Genotípica	0,174	<b>0,029*</b>	0,121	<b>0,032*</b>	0,497	0,108
<b>IL10-</b>	Alélica	<b>0,039*</b>	0,350	0,203	<b>0,029*</b>	0,969	0,165
<b>1082</b>	Genotípica	0,124	0,482	0,439	0,094	0,946	0,379

\*p-Fisher < 0,05

Al comparar las frecuencias en pacientes sensibilizados a epitelios se encontró asociación significativa en la distribución del genotipo TT, más frecuente en pacientes (15,6%) que en controles (3,8%). Al ajustar por edad y sexo pareando por edad se obtuvo una p de Fisher de la regresión de 0,008; OR: 11,18 (1,86 – 67,04).

También se detectó que el genotipo TT era más frecuente en pacientes sensibilizados a más de un alérgeno (14,3%) que en los controles (3,8%), p de Fisher de 0,028. Al ajustar por edad y sexo se mantuvo la significación estadística, obteniéndose en la regresión una p-Fisher de 0,005; OR: 9,10 (1,96 – 42,23).

La comparación de frecuencias del polimorfismo *IL12B* -1188 en los pacientes con pruebas cutáneas positivas a ácaros resultó significativa tanto para alelos como para genotipos. Se obtuvo una p=0,007; OR: 1,90 (1,19 – 3,03) resultante de la comparación de la frecuencia del alelo C en pacientes (27,8%) y controles (16,9%). La comparación de las frecuencias genotípicas mostró una significación de 0,013 como consecuencia de la diferencia en la distribución del genotipo AC en los pacientes (43%) respecto a los controles (25,2%). Al ajustar por edad y sexo se mantuvo la significación obteniéndose una p-Fisher de la regresión de 0,001 con una OR: 4,62 (1,83 – 11,66).

Este polimorfismo también resultó significativo al ser analizado en los pacientes sensibilizados a más de un alérgeno: El análisis de frecuencias alélicas mostró significación (p=0,023, OR: 1,773 [1,08 – 2,92]) donde se observó una frecuencia mayor del alelo C en pacientes (26,5% frente a un 16,9% en controles). El análisis de frecuencias genotípicas resultó significativo (p= 0,049), con una mayor frecuencia del genotipo AC en los pacientes (40,9%) que en controles (25,2%). Esta significación volvió a ponerse de manifiesto obteniéndose una p-Fisher en la regresión de 0,04; OR: 2,94 (1,05 – 8,27).

El polimorfismo en posición -308 del gen del *TNFA* mostró intensa asociación con la sensibilización alérgica, principalmente en la distribución de frecuencias alélicas, tal como se muestran en la tabla 14.

Con respecto a la distribución de frecuencias genotípicas del polimorfismo *TNFA* -308, se encontraron diferencias significativas en la distribución del genotipo GA en los pacientes sensibilizados a pólenes y ácaros (19,5%) frente a los controles (9,8%), con una  $p=0,018$  (en este caso, no se cumplió el equilibrio de Hardy-Weimberg en los casos,  $p= 0,047$ ). También se encontró asociación del genotipo AG en los pacientes polisensibilizados (18,3% vs 9,8 % en controles), con una  $p=0,028$  (en este caso tampoco se cumple el equilibrio de Hardy-Weimberg en los casos,  $p = 0,021$ ).

**Tabla 14.** Estudio comparativo en las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *TNFA* -308 de controles y pacientes con sensibilidad alérgica mediante P de Fisher

SENSIBILIZACIÓN	Frecuencia (Alelo A)	p-Fisher	OR
ÁCAROS	0,134	0,008	2,34 (1,22-4,47)
PÓLENES	0,114	0,035	1,95 (1,04-3,66)
ÁCAROS Y PÓLENES	0,171	0,002	3,11 (1,49-6,51)
MÁS DE UN ALÉRGENO	0,148	0,003	2,62 (1,30-5,05)

Las frecuencias alélicas del polimorfismo en posición 166 de *IL2* mostraron asociación con la sensibilización a pólenes, pólenes y ácaros y polisensibilización (tabla 15).

### 5.2.4 GRAVEDAD DEL ASMA

En el análisis de frecuencias alélicas y genotípicas en función de la gravedad de asma se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con diferentes polimorfismos, tal como se muestra en la tabla 16.

**Tabla 15.** Estudio comparativo en las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *IL2 166* de controles y pacientes con sensibilidad alérgica mediante P de Fisher.

SENSIBILIZACIÓN	Frecuencia (Alelo T)	p-Fisher	OR
Ácaros	0,134	0,008	2,34 (1,22-4,47)
Pólenes	0,392	0,014	1,62 (1,10 – 2,38)
Ácaros y pólenes	0,402	0,042	1,69 (1,02 – 2,82)
Más de un alérgeno	0,381	0,048	1,54 (1,00 – 2,38)

Se encontró una asociación significativa en las frecuencias del alelo A en posición -308 de *TNFA*, más representado en pacientes con asma persistente moderada que en los controles. Los valores estadísticos se muestran en la tabla 17.



**Tabla 16.** Estudio comparativo en las frecuencias alélicas y genotípicas de controles y pacientes con asma en función de la gravedad mediante P de Fisher.

		INTERMITENTE	PERSISTENTE	P. LEVE	P. MODERADA	P. GRAVE	P.MODERADA + GRAVE
<b>IL1B 3962</b>	Alélica	<b>0,032*</b>	0,345	0,160	0,875	0,189	0,675
	Genotípica	0,119	0,404	0,121	0,921	0,422	0,829
<b>IFNG 874</b>	Alélica	0,156	0,387	0,530	<b>0,016*</b>	0,665	0,125
	Genotípica	0,461	0,584	0,853	<b>0,043*</b>	0,882	0,223
<b>IL12 -1188</b>	Alélica	<b>0,012*</b>	0,101	0,055	0,750	0,069	0,312
	Genotípica	<b>0,046*</b>	0,095	0,069	0,319	0,223	0,320
<b>TNFA -308</b>	Alélica	0,099	0,055	0,718	<b>0,027*</b>	<b>0,021*</b>	<b>0,008*</b>
	Genotípica	0,316	<b>0,048*</b>	0,725	<b>0,046*</b>	<b>0,011*</b>	<b>0,008*</b>
<b>IL2 166</b>	Alélica	0,157	0,051	0,349	0,076	0,170	<b>0,043*</b>
	Genotípica	0,180	0,139	0,621	0,199	0,257	0,118
<b>IL6 -174</b>	Alélica	<b>0,036*</b>	0,133	0,116	0,594	0,218	0,328
	Genotípica	0,109	0,335	0,253	0,562	0,288	0,590

**\*p-Fisher < 0,05**

El análisis de las frecuencias genotípicas en función del grado de asma mostró una asociación del genotipo GA con el asma persistente ( $p= 0,047$ ), especialmente la persistente grave ( $p= 0,011$ ) y con el asma persistente moderada o grave ( $p = 0,008$ ). En todos los casos, el genotipo GA fue más frecuente en los pacientes (19,7%, 30,8% y 24,2%, respectivamente, frente al 9,8% en controles). Al ajustar por edad y sexo se mantuvo la significación, obteniéndose una  $p$  de Fisher < 0,001, OR: 10,55 (3,08 - 36,20), con un poder

estadístico del 96% y una FPRP de 3,4%, con una probabilidad *a priori* del 10% (0,1% si 25), en el caso del asma persistente grave; p-Fisher= 0,009 OR: 3,194 (1,33 - 7,57).

**Tabla 17.** Asociaciones significativas del polimorfismo *TNFA* -308 con la gravedad del asma

GRADO DE ASMA	Frecuencia (Alelo A)	p-Fisher	OR
<b>Persistente Moderada</b>	0,123	0,027	2,124 (1,079-4,182)
<b>Persistente Grave</b>	0,154	0,021	2,746 (1,134-6,654)
<b>Persistente Moderada y Grave</b>	0,131	0,008	2,283 (1,227-4,249)

## LA TRÍADA DE LA ASPIRINA

Al analizar el conjunto de polimorfismos entre pacientes con tríada de la aspirina y controles, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los polimorfismos *TNFA* -238, *IL2* -330 y *IL 2* 166 (tabla 18).

Con respecto al polimorfismo *IL2* -330, las frecuencias del genotipo GG mostraron asociación con la intolerancia a los antiinflamatorios no esteroideos y con la tríada de la aspirina. En los individuos con ASA tríada, el genotipo GG resultó ser más frecuente en los pacientes (40% frente al 10,4% en controles), con una p-Fisher= 0,019. En el caso de la intolerancia a antiinflamatorios no esteroideos se obtuvo una p de Fisher de 0,005. Al ajustar por edad y sexo, se perdió la significación.

El análisis del polimorfismo *IL2 166* mostró asociación significativa de las frecuencias genotípicas con la poliposis. El genotipo TT resultó ser más abundante en los pacientes con poliposis (27,3% frente al 7,6% en controles). Al ajustar por edad y sexo, se obtuvo una p de Fisher en la regresión de 0,017, OR: 4,36 (1,29 – 14,67).

**Tabla 18.** Estudio comparativo en las frecuencias alélicas y genotípicas de controles y pacientes con tríada de la aspirina mediante P de Fisher.

SNP	iAINE		POLIPOSIS		ASA tríada	
	p-Fisher Alélica	p-Fisher Genotípica	p-Fisher Alélica	p-Fisher Genotípica	p-Fisher Alélica	p-Fisher Genotípica
<b><i>TNFA -238</i></b>	0,144	0,061	0,219	0,331	<b>0,013*</b>	<b>0,030*</b>
<b><i>IL2 -330</i></b>	0,109	<b>0,005*</b>	0,777	0,099	0,097	<b>0,019*</b>
<b><i>IL2 166</i></b>	0,694	<b>0,043*</b>	<b>0,048*</b>	<b>0,018*</b>	0,533	0,367

\*p-Fisher < 0,05

### 5.3 ESTUDIO DE HAPLOTIPOS Y DIPLIOTIPOS

#### GEN DE *IL1B* (Posiciones -511/3961)

En el análisis de haplotipos del gen *IL1B* se obtuvo una asociación estadísticamente significativa con distintas características clínico-biológicas (ver tabla 19). En especial, el haplotipo TT (posiciones 3962/-511), que se observó asociado a la gravedad del asma ( $p < 0.001$ ). También se observó asociado con la sensibilización tanto a pólenes como a hongos.

El estudio de diplotipos (posiciones 3962/-511) no resultó especialmente significativo: se encontró asociación estadísticamente significativa entre la presencia del diplotipo TT CT y la presencia de sensibilización a ácaros y epitelios, así como al grado de gravedad del asma. Dicha asociación se perdió al ajustar por edad y sexo. Cabe destacar que este diplotipo fue infrecuente en la muestra (solamente se encontró en 5 individuos del total estudiados), si bien todos ellos resultaron ser pacientes.

**Tabla 19.** Haplotipos significativos en el análisis del gen de *IL1b*

GRUPO CLÍNICO	HAPLOTIPO	P de Fisher	OR	IC 95%
ASMA	TT	0,017	4,45	1,16-16,97
ASMA ATÓPICA	TT	0,014	4,68	1,20-18,21
A. FAM ASMA	TT	0,012	5,24	1,23-22,28
A. FAM ASMA Y ATOPIA	TT	0,003	6,80	1,56-29,59
SENS. PÓLENES	TT	0,006	5,78	1,43-23,29
SENS. HONGOS	TT	<0,0001	14,70	2,60-83,10
POLISENSIBILIZADOS	TT	0,016	5,17	1,17-22,85
ASMA P LEVE	TT	<0,001	8,53	1,93-37,82
ASMA P GRAVE	TT	<0,0001	13,	92 2,99-4,87
ASMA PERSISTENTE	TT	0,007	5,34	1,37-20,82
POLIPOSIS	TT	0,031	5,71	0,97-33,62

**GEN *TNFA* (-308/-238)**

En el análisis de haplotipos del gen *TNFA* (posiciones -308/-238) se obtuvo una asociación estadísticamente significativa con distintas características clínico biológicas (ver tabla 20).

**Tabla 20.** Haplotipos significativos en el análisis del gen del *TNFA* (-308/-238)

GRUPO CLÍNICO	HAPLOTIPO	MODELO DE HERENCIA	GRUPO SIGNIFICATIVO	P-Fisher	OR
<b>SENS. PÓLENES Y ÁCAROS</b>	AG	DOMINANTE	PACIENTES	0,022	2,89 (1,23 - 6,80)
<b>POLISENSIBILIZADOS</b>	AG	DOMINANTE	PACIENTES	0,017	2,48 (1,18-5,22)
<b>SENS. PÓLENES</b>	GG	RECESIVO	CONTROL	0,019	0,51 (0,23-0,87)
<b>ASA triada</b>	GG	RECESIVO	CONTROL	0,009	0,21 (0,07-0,68)

Principalmente, estas asociaciones se encontraron con la sensibilización alérgica y la tríada de la aspirina. En ambos casos, el haplotipo AG resultó ser más frecuente en los pacientes, mientras que el haplotipo GG resultó más frecuente en los controles.

**Tabla 21.** Asociación del diplotipo AG GG del TNFA (-308/-238)

GRUPO CLÍNICO	DILOTIPO	P-Fisher	P-Fisher regresión (OR)
<b>ASMA</b>	AG GG	0,032	0,03: 1,90 (1,06- 3,41)
<b>ASMA NO ATÓPICA</b>	AG GG	0,037	0,029: 2,70 (1,11 - 6,58)
<b>ASMA PERSISTENTE MODERADA</b>	AG GG	<b>0,032</b>	<b>0,022: 2,51 (1,14 - 5,54)</b>
<b>ASMA PERSISTENTE GRAVE</b>	AG GG	<b>0,015</b>	<b>0,012: 3,78 (1,35 - 10,60)</b>
<b>ASMA PERSISTENTE MODERADA Y GRAVE</b>	AG GG	<b>0,005</b>	<b>0,005 (2,81 (1,36 - 5,82)</b>

Estas asociaciones fueron confirmadas con el estudio de diplotipos de ambos polimorfismos (-308/-238), en el que el diplotipo AG GG se observó asociado a la gravedad del asma ( $p=0,005$ ) (tabla 21), mientras que el diplotipo GG GG (tabla 22) se observó con más frecuencia en los controles que en los pacientes con sensibilización a más de un alérgeno ( $p=0,005$ ), y con triada de la aspirina ( $p=0,009$ ).

**Tabla 22.** Asociación del diplotipo GG GG del TNFA (-308/-238)

GRUPO CLÍNICO	DIPLOTIPO	P-Fisher	P-Fisher regresión (OR)
ASMA	GG GG	0,023	0,032: 0,49 (0,254 - 0,9429)
ASMA ATÓPICA	GG GG	0,022	0,019: 1,79 (1,10 - 2,89)
SENS. PÓLENES	GG GG	0,019	0,013: 1,98 (1,15 - 3,40)
SENS. EPITELIOS	GG GG	0,027	0,016: 2,51 (1,19 - 5,27)
SENS. PÓLENES + ÁCAROS	GG GG	0,032	0,023: 2,30 (1,13 - 4,73)
POLISENSIBILIZADO	GG GG	0,005	0,003: 2,48: (1,37 - 4,51)
ASA triada	GG GG	0,009	0,01: 4,72: (1,45 - 15,29)
ASMA PERSISTENTE MODERADA	GG GG	0,030	0,029: 1,94 (1,07 - 3,53)
ASMA PERSISTENTE MODERADA Y GRAVE	GG GG	0,017	0,017: 1,95 (1,12 - 3,37)

### GEN *TGFB1* (c10/c25)

En el análisis de haplotipos del gen *TGFB1* (posiciones c10/c25) se obtuvo una asociación estadísticamente significativa con distintas características clínico-biológicas (ver tabla 23). El haplotipo TG se observó con más frecuencia en los controles que en los pacientes con sensibilización alérgica a hongos. Aunque se detectaron otras asociaciones con  $p < 0.05$

(tabla 18), éstas no alcanzaron un poder estadístico superior al 80%. El análisis de diplotipos no mostró resultados estadísticamente significativos.

**Tabla 23.** Haplotipos significativos en el análisis del gen del *TGFB1*.

GRUPO CLÍNICO	HAPLOTIPO	P-Fisher	OR
SENS HONGOS	C G	0,040	3,08 (1,01-9,40)
	T C	0,012	8,82 (1,16-67,19)
	T G	0,009	0,179 (0,04-0,74)
ASA triada	T C	0,030	5,61 (0,98-32,02)

### GEN *IL4* (-1098/-590/-33)

En el análisis de haplotipos del gen de *IL 4* (posiciones -1098/-590/-33) se obtuvo una asociación estadísticamente significativa con distintas características clínico-biológicas (ver tabla 24). Principalmente, esta asociación se encontró en el haplotipo GTT con la presencia de poliposis ( $p = 0,007$ ), en la que a pesar de las diferencias significativas, el poder estadístico no alcanzó el 80% con una FPRP del 6,7% para una probabilidad *a priori* del 10%.

### GEN *IL2* (-330/166)

En el análisis de haplotipos del gen de *IL 2* se obtuvo una asociación estadísticamente significativa con distintas características clínico-biológicas (ver tabla 25). Se encontró asociación del haplotipo TT (-330 y 166) con la presencia de asma atópica, sensibilidad a



pólenes y antecedentes familiares de asma. El haplotipo TG se observó con más frecuencia en los controles que en los individuos con asma no atópica ( $p = 0,016$ ).

**Tabla 24.** Haplotipos significativos en el análisis del gen *IL4*.

GRUPO CLÍNICO	HAPLOTIPO	p de Fisher	OR
A. F. DE ASMA	T C C	0,011	2,19 (1,18-4,04)
A. F. DE ATOPIA	T C C	0,023	1,928 (1,08-3,42)
A. F. ASMA Y ATOPIA	T C C	0,022	2,25 (1,11-4,53)
A. F. ASMA O ATOPIA	T C C	0,016	1,89 (1,10-3,19)
HONGOS	G T T <sup>‡</sup>	0,002	77,89 (3,62-1670,42)
POLIPOSIS	G T T	0,007	68,42 (3,85-1215,15)

<sup>‡</sup> El haplotipo GTT resultó ser dominante en pacientes con poliposis,  $p = 0,02$ , OR: 0,132 (0,089 – 0,197)

En el análisis de diplotipos del gen *IL2* se obtuvo una asociación estadísticamente significativa con distintas características clínico biológicas (ver tabla 26). En especial con el diplotipo TT TT, asociado a la sensibilidad alérgica a pólenes y epitelios. También resultó llamativa la asociación del diplotipo GG GG con la intolerancia a antiinflamatorios no esteroideos.

**Tabla 25.** Haplotipos significativos en el análisis del gen de *IL 2* (-330/166)

GRUPO CLÍNICO	HAPLOTIPO	P-Fisher	OR	MODELO DE HERENCIA	GRUPO ASOCIADO	P-Fisher	OR
<b>ASMA ATÓPICA</b>	TT	0,019	1,51: (1,07-2,13)	RECESIVO	PACIENTES	0,032	2,31 (1,09 - 4,88)
<b>SENS. PÓLENES</b>	TT	0,014	1,62: (1,10-2,34)	RECESIVO	PACIENTES	0,014	2,79 (1,25 - 6,21)
<b>A. FAM. ASMA</b>	TT	0,017	1,65: (1,09-2,49)	RECESIVO	PACIENTES	0,01	2,93 (1,27 - 6,74)
<b>ASMA NO ATÓPICA</b>	TG	0,016	0,51: (0,21-0,89)	DOMINANTE	CONTROLES	0,013	0,41 (0,20 - 0,83)
<b>ASA tríada</b>	TG	0,029	0,27: (0,08-0,94)	--		--	--

**Tabla 26.** Análisis de diplotipos del gen de *IL 2* (-330/166)

GRUPO CLÍNICO	DIPLÓTIPO	P-Fisher	P-Fisher regresión (OR)
<b>ANTECEDENTES FAMILIARES DE ASMA</b>	TT TT	0,015	0,012: 2,90 (1,26 - 6,69)
<b>SENS. PÓLENES</b>	TT TT	0,014	0,012: 2,81 (1,26 - 6,25)
<b>SENS. EPITELIOS</b>	TT TT	0,015	0,011: 3,69 (1,35-10,07)
<b>POLIPOSIS</b>	TT TT	0,016	0,011: 4,24 (1,39-12,92)
<b>IAINE</b>	GG GG	0,008	0,006: 4,02 (1,48- 10,87)

**GEN IL6 (-174/nt565)**

En el análisis de haplotipos del gen *IL 6* (posiciones -174/nt565) se obtuvo una asociación estadísticamente significativa con distintas características clínico-biológicas. Principalmente esta asociación se encontró en el haplotipo CA, más frecuente en los controles que en individuos con presencia de asma,  $p=0,034$ , OR: 0,70 (0,51-0,98) y asma no atópica,  $p=0,030$ , OR: 0,53 (0,30-0,95) en la que, a pesar de las diferencias significativas, el poder estadístico no alcanzó el 80%. Estos resultados son concordantes con el efecto protector de ambas mutaciones reportado en el análisis alélico. En el caso de la asociación con el asma no atópica se detectó un modelo de herencia dominante, con una  $p=0,03$ , OR: 0,44 (0,22-0,92).

El análisis de diplotipos en el gen de la *IL6* mostró únicamente cierta asociación entre la mayor presencia del diplotipo CA CA en los controles frente a los pacientes con tríada de la aspirina, pero con un poder estadístico que no alcanzó el 80% en ningún caso. Cabe resaltar que el diplotipo CACA no se encontró en ningún individuo con ASA tríada, mientras que se encontró en un 14,1% de los controles.

**GEN (IL 10 -1082/-819/-592)**

El análisis de haplotipos del gen de *IL 10* (posiciones 1082/-819/-592) mostró una asociación estadísticamente significativa con la sensibilidad alérgica, si bien la escasa representatividad de esos haplotipos (en concreto del haplotipo GTC), no permitió alcanzar un poder del 80%. En el análisis de diplotipos se encontró que el diplotipo ACC ATA se asociaba con la tríada de la aspirina, con una  $p$  de Fisher (obtenida tras regresión logística) de 0,034 OR: 3,80 (1,11-13,09), que tampoco alcanzó el 80% de poder estadístico.

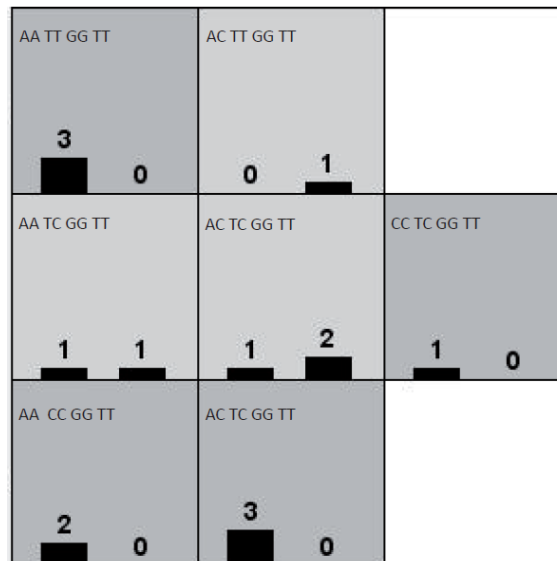
## 5.4 COMBINACIONES GÉNICAS EN EL ASMA ALÉRGICA

En la tabla 27 se muestran las combinaciones más significativas encontradas al comparar los 22 polimorfismos entre controles y pacientes con asma alérgica. Se tomaron como estadísticamente significativas aquellas combinaciones en las que se obtuvo una  $p < 0,005$ .

**Tabla 27.** Combinaciones con mayor significación en el análisis de pacientes con asma atópica

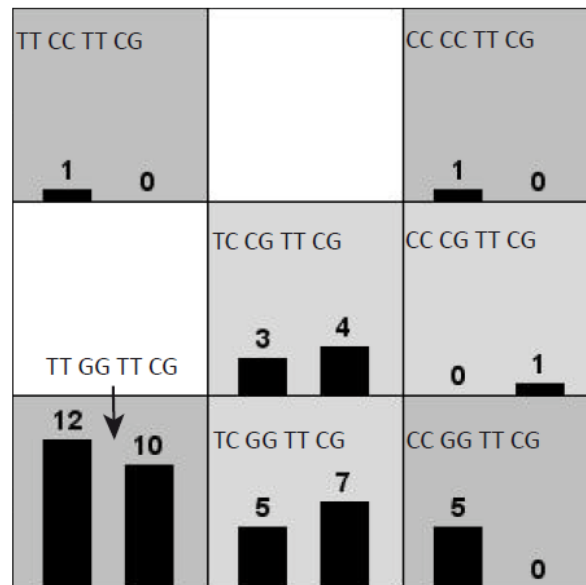
COMBINACIÓN	CVC <sup>‡</sup>	TBA <sup>¥</sup>	p
<i>IL12 -1188/ TGFB1 c10/ IL6 nt565/ IL10 -819</i>	10	0.6655	0,001
<i>IL2 166/ IL6 nt565/ IL10 -1082</i>	10	0.6533	0,002
<i>IL2 166/ IL6 nt565/ IL10 -592</i>	10	0.6506	0,003
<i>TGFB1 c10/ TGFB1 c25/ IL2 -330/ IL6 -174</i>	10	0.6501	0,004

<sup>‡</sup>CVC: “Cross-Validation Consistency”: Coeficiente que indica la identificación de un modelo de reducción multidimensional. Oscila entre 1 y 10, siendo 10 el máximo CVC, que indica que en todas las iteraciones llevadas a cabo por el programa ha encontrado la misma combinación. <sup>¥</sup>TBA: “Testing Balanced Accuracy”: Coeficiente de la combinación de sensibilidad y especificidad del modelo, que indica la exactitud de la predicción.



**Figura 41.** Análisis de la combinación formada por los SNP *IL12 -1188/ TGFB1 c10/ IL6 nt565/ IL10 -819*. Cada casilla representa una combinación determinada. La gradación de sombra en una casilla representa la probabilidad de asociación con la patología de una determinada combinación, de manera que cuanto más oscuro sea el sombreado, mayor probabilidad de asociación con la patología. Las columnas en cada casilla representan en número de controles (columna derecha) y el de pacientes (columna izquierda).

La combinación en la que se encuentra una asociación más significativa es la formada por los polimorfismos *IL12B -1188 / TGFB1 c10 / IL6 nt565 / IL10 -819*, (Figura 13): Combinación con un CVC de 10 y un error de predicción del 33,45% (tras 1000 permutaciones,  $p= 0,001$ ). La elevada significación detectada en éste caso se debe a que varias de las combinaciones de estos 4 SNP se dan íntegramente en el grupo de pacientes (ver figura 41). Sin embargo, la capacidad de predicción de estas combinaciones no es muy elevada porque el número de pacientes por cada combinación es escaso, un máximo de sólo tres por grupo.



**Figura 42.** Análisis de la combinación formada por los SNP *TGFβc10*, *TGFβc25*, *IL2 -330* e *IL6 -174*: La combinación CC GG TT CG se encontró en 5 pacientes con asma alérgica y ningún control.

Otra combinación en la que se encontraron diferencias llamativas entre controles y pacientes fue en la formada por los polimorfismos *TGFβc10*, *TGFβc25*, *IL2 -330* y *IL6 -174*, con un CVC de 10 y un error de predicción del 34,99% (tras 1000 permutaciones,  $p=0,004$ ). El seguimiento de esta combinación en nuestro estudio permitió detectar que todos los individuos que portaban la combinación CC GG TT CG eran pacientes con asma atópica (Figura 42); de nuevo, el escaso número de pacientes no permite confirmar la capacidad de predicción de esta combinación

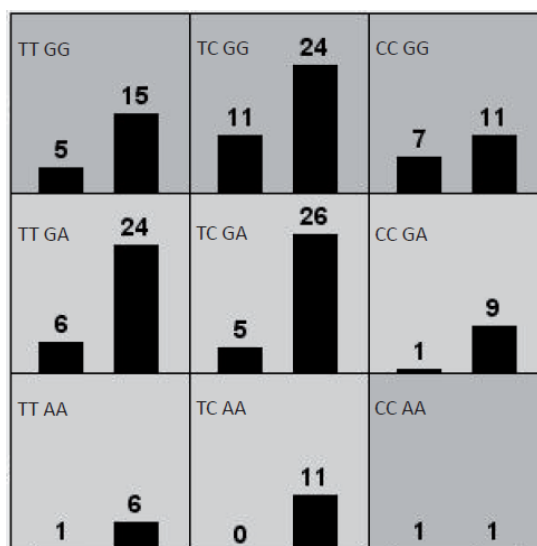
## 5.5 COMBINACIONES GENICAS EN ASMA NO ALÉRGICA

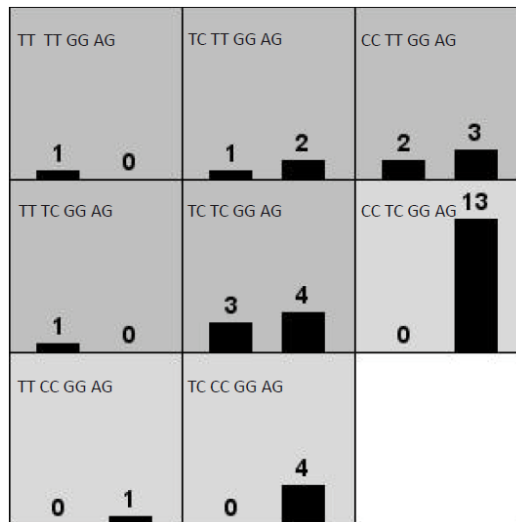
En la tabla 28 se muestran las combinaciones más significativas encontradas al comparar los 22 polimorfismos entre controles y pacientes con asma no alérgica. Se tomaron como estadísticamente significativas aquellas comparaciones en las que se obtuvo un p-valor  $<0,005$ .

**Tabla 28.** Combinaciones con mayor significación en el análisis de pacientes con asma no atópica.

SITIOS	CVC	TBA	P-Valor
<b>IL1R pst1 1970/ IL12 -1188/ IL2 -330/ IL10 -819</b>	10	0.7668	0,001
<b>TGFB1 c10/ IL6 nt565</b>	8	0.7228	0,002
<b>IL1R pst1 1970/ g-IFN 874</b>	10	0.7204	0,003
<b>L1b -511/ TGFB1 c10/ IL2 166/ IL10 -1082</b>	10	0.7123	0,004

El seguimiento de las combinaciones más significativas representadas en la tabla 27 permitió detectar que los 11 individuos que portaban la combinación formada por los polimorfismos *TGFB1 c10* y *IL6 nt565*, TC AA eran controles, reforzando, probablemente, el carácter protector del SNP *IL6nt565* anteriormente descrito (figura 43). Del mismo modo, el seguimiento de la combinación *IL1B -511*, *TGFB1 c10*, *IL2 166* y *IL10 -1082*, ha permitido observar que los todos los individuos portadores de esta combinación CC TC GG AG eran controles (figura 43).

**Figura 43.** Análisis de la combinación formada por los SNP *TGFB1c10* e *IL6nt565*: La combinación TC AA se encontró en 11 controles y en ningún paciente con asma no alérgica.



**Figura 44.** Análisis de la combinación formada por los SNP *IL1B* -511, *TGFB1* c10, *IL2* 166 e *IL10* -1082: La combinación CC TC GG AG se encontró en 13 controles y en ningún paciente con asma no alérgica.



# DISCUSIÓN

---





## 6. DISCUSIÓN

En este estudio se han analizado 22 polimorfismos correspondientes a 13 genes en 376 individuos, de los que se han analizado más de 165 variables tanto fenotípicas como genotípicas, de manera que en total se han analizado más de 60000 datos. A continuación se discutirán los resultados obtenidos en relación con cada una de las citocinas analizadas.

### GENES DEL “CLUSTER” DE LA INTERLEUCINA 1

La IL-1 es una citocina proinflamatoria que presenta dos formas codificadas por genes distintos, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , cuyas actividades biológicas son prácticamente indistinguibles. Desempeña un papel fundamental en la presentación antigénica y en la respuesta inflamatoria inmediata. En este estudio se han analizado varios polimorfismos presentes en el *cluster* de la IL-1: un polimorfismo del gen *IL1A* (rs 1800587), dos polimorfismos del *IL1B* (rs 16944 y rs 1143634), un polimorfismo del gen del Receptor de tipo I de la IL-1 (*IL1R1*) (rs 2234650) y un polimorfismo del gen del agonista del receptor de la IL-1 (*IL1RN*) (rs 315952).

En el presente trabajo se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa del polimorfismo rs 1143634 del gen *IL 1B* con el asma atópica. Este polimorfismo se encuentra en una región codificante (posición 3953), en la que un cambio de una C por una T produce una mutación sinónima, es decir, no modifica el aminoácido codificado. Se ha encontrado asociación estadísticamente significativa entre este polimorfismo y la presencia de asma atópica en especial si los individuos se encontraban sensibilizados a pólenes o epitelios y sobre todo si la sensibilización era a más de un grupo de alérgenos. También se ha encontrado una asociación significativa con el grado de asma, en concreto con la presencia de asma intermitente.

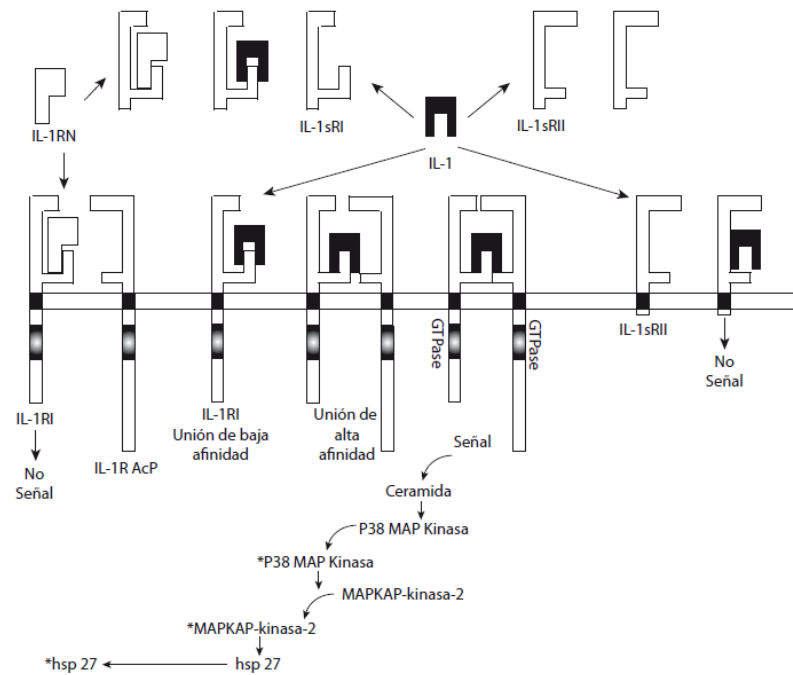
Además, al analizar el polimorfismo *IL-1RN MspI 11100*, en el que se produce una mutación sinónima debido a un cambio de una T por una C, se detectó una cierta significación (poder estadístico del 77% con un FPRP del 29,6%, con una probabilidad a priori de asociación con la patología del 10%) con la sensibilización a hongos encontrándose el alelo mutado (C) con mayor frecuencia en los pacientes.

No se encontró asociación significativa estudiando individualmente el polimorfismo en posición -511 del gen *IL1B*, pero si en el estudio de haplotipos, en el que el haplotipo TT (posiciones -511/3965) se encontró significativamente en mayor proporción en los pacientes con asma atópica, fundamentalmente en aquellos sensibilizados frente a hongos, aunque también se encontró asociación en los individuos sensibilizados pólenes. El haplotipo TT también resultó ser más frecuente en los individuos con asma persistente. La relación de los polimorfismos de *IL1* con el asma ha sido estudiada previamente por Mahdaviani y colaboradores [153]; estos autores detectaron una asociación de los SNP -889 *IL1A*, -511 *IL1B* y *IL1RN MspI* y la presencia de asma en una población Iraní, que incluyó a 140 controles y 60 pacientes con asma. Sin embargo en ese estudio no se especificaron las características clínicas del asma de los pacientes, por lo que se desconoce la proporción de individuos atópicos. Además, el polimorfismo en posición -511 de *IL1B* ha sido asociado con la poliposis nasosinusal, tanto en presencia [139] como en ausencia de asma [140]. La relación de polimorfismos presentes en estos genes ha sido motivo de estudio en varias patologías de base inflamatoria, como el queratocono [135]. El grupo anteriormente citado, además, llevó a cabo un estudio de haplotipos agrupando los polimorfismos en función del desequilibrio de ligamiento de los mismos en tres grupos, encontrándose asociación significativa en el estudio de la combinación de los polimorfismos -31/-511 de *IL1B*.

El polimorfismo-889 de *IL 1A* ha sido asociado también con la gravedad de la periodontitis en pacientes fumadores [136] así como con la enfermedad de Alzheimer, relacionado con el importante papel de la inflamación en la patología de esta enfermedad [137, 138].

El IL-1RN es una importante molécula antiinflamatoria, cuya función principal es inhibir la actividad inflamatoria de la IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , por lo que es un elemento fundamental en la modulación de la respuesta inmunitaria [146]. El gen que codifica esta molécula ha sido asociado a diferentes patologías con marcado componente inflamatorio, como la Diabetes de tipo I o la gravedad del Lupus Eritematoso Sistémico [146]. Mao y colaboradores [270] han propuesto la importancia del equilibrio entre los niveles de IL-1 y su antagonista en la progresión del componente inflamatorio en patologías como el asma, encontrando una asociación significativa de este polimorfismo con el asma no atópica y el eczema atópico. Sin embargo, estos resultados no coinciden con los obtenidos en otros grupos, en los que se han asociado polimorfismos del gen que codifica la IL1RN con la presencia de asma asociada a niveles elevados de IgE [144, 145] .

El receptor de tipo I de la IL-1 (IL-1RI) es una proteína que actúa como receptor de la IL-1 $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  y del IL-1Rn. Se trata de un importante mediador involucrado en la mayoría de las respuestas inmunes e inflamatorias mediadas por estas citocinas, ya que su principal función es desencadenar en el interior celular las respuestas fisiológicas a estas citocinas (figura 45).



**Figura 45.** Mecanismo efector de IL1R: el receptor de tipo I de la IL-1 puede: unirse al IL-1RN, impidiendo la cascada de señales intracelulares; Unirse sólo a IL-1 con baja afinidad; unirse a IL-1 y a un receptor de IL-1 tipo II, desencadenando la transducción de señales al interior celular.

En este estudio hemos analizado el polimorfismo *IL1R1 pstI 1970* (rs 2234650) sin encontrar ninguna asociación significativa. No se encuentran muchos estudios que describan asociaciones de variantes alélicas de este gen con enfermedades. Cabe destacar algunos estudios que intentan relacionarlo con diversas enfermedades inmunológicas. Así, ha sido estudiado en pacientes con oftalmopatía de Graves [150], inmunodeficiencia variable común [151], vasculitis y [152], sin que se haya encontrado asociación significativa. Sin embargo sí que se ha encontrado una asociación significativa de este polimorfismo con la gravedad de la Esclerosis Múltiple [154] y la Diabetes del tipo I [155]. Este polimorfismo también fue estudiado por Mahdaviyani y col., quienes no encontraron asociación de este polimorfismo con el asma [153]

La proximidad en la localización genómica de los genes *IL1A*, *IL1B* e *IL1RN*, localizados en el brazo largo del cromosoma 2, justifica el análisis conjunto de los cuatro polimorfismos estudiados en estos tres genes. Se encontró una asociación significativa del haplotipo CCCT, de las posiciones 3962 de *IL1B* / -511 de *IL1B* / 889 de *IL1A* / *MspI* de *IL1RN* en pacientes asmáticos con antecedentes familiares de asma o alergia. La asociación de esta combinación con los antecedentes familiares de asma o alergia podría estar relacionada con una desregulación heredada en el equilibrio IL-1 / IL-1R $\alpha$  que a su vez podría estar relacionado con el desarrollo de la patología.

## GEN DE LA INTERLEUCINA 2

La principal función de la IL-2 es estimular el crecimiento y proliferación de los linfocitos T y otras células inmunitarias, además de inducir la síntesis de otras citocinas y moléculas pro-inflamatorias. En este estudio se han analizado dos polimorfismos del gen *IL2*. El primero de ellos se encuentra en la región promotora, en posición -330 (rs2069762), una zona de unión de factores de transcripción. Se ha propuesto que la presencia de éste polimorfismo en homocigosis tiene como consecuencia un incremento en la expresión de la IL-2 [165]. El segundo se encuentra en la región codificante, en la posición +166 (rs2069763) y produce una mutación sinónima. Este cambio es interesante puesto que se encuentra en una región “potenciadora del ajuste exónico” (ESE: *exonic splicing enhancer*), por lo que este tipo de polimorfismos podrían jugar un papel fundamental en la expresión génica.

En este estudio hemos encontrado asociación del polimorfismo en posición -330 con el asma no atópica, la intolerancia a los AINE y la tríada de la aspirina, patologías en las que el alelo mutado G resultó más frecuente que en los controles. Esto puede deberse en parte a que las tres entidades pueden estar relacionadas, pues precisamente son los pacientes con asma

no atópica los que con mayor frecuencia pueden evolucionar a una tríada del AAS. En cuanto a los escasos estudios publicados sobre este gen en el asma, destaca el publicado por Christensen y col.[166], que llevaron a cabo un estudio de asociación del polimorfismo en posición -330 de *IL2* con la presencia de diferentes fenotipos atópicos (asma, rinitis, dermatitis atópica) en familias danesas y encontraron que el alelo T se transmitía a la descendencia con una frecuencia significativamente mayor en los individuos afectados. Este grupo de trabajo ha asociado la presencia del alelo T a la generación de un sitio de unión a factores de transcripción TCF11/MafG, asociados a la regulación negativa de la transcripción, por lo que según el análisis *in silico*, los portadores del alelo T mostrarían una menor expresión de *IL2*, que podría provocar una desviación del equilibrio Th1-Th2 hacia Th2. En nuestro estudio encontramos una frecuencia ligeramente superior del alelo T en los individuos atópicos (72,8%) frente a controles (68,1%) que no llegó a alcanzar significación estadística. Como se ha comentado anteriormente, lo que nosotros si encontramos con significación estadística es la mayor frecuencia del alelo G en individuos no atópicos lo que nos lleva a plantear la posibilidad de que la presencia de G podría impedir la generación del sitio de unión del factor inhibidor de la transcripción, por lo que se expresaría una mayor cantidad de IL-2, desviando la balanza hacia Th1 en el caso de los sujetos no atópicos. Los resultados del análisis *in silico* llevado a cabo por Christensen y col, se encuentran respaldados por los hallazgos de Hoffman y col. [271], que estudiaron los niveles de expresión de *IL2* en función del genotipo de *IL2* -330 en células en cultivo, y encontraron que la expresión se encontraba sensiblemente aumentada cuando el genotipo de las células era GG con respecto a GT o TT.

Hemos encontrado también una asociación del polimorfismo de *IL 2* en posición 166 con la presencia de asma, con el asma atópica, los antecedentes familiares de asma y atopia, la sensibilización a los pólenes, a los pólenes y ácaros, a los epitelios, la polisensibilización, la



poliposis nasosinusal y el asma persistente moderado o grave. En todos los casos, la asociación resultó ser significativa debido a una mayor representación del alelo mutado T en los pacientes. Sin embargo el poder estadístico de estas asociaciones no fue muy elevado lo que resulta un claro ejemplo de que no es suficiente una significación estadística superior al 0,05 para constatar asociaciones génicas. En cualquier caso, Christensen y col.[166] encontraron una asociación de este polimorfismo con la positividad de las pruebas cutáneas, y llevaron a cabo un estudio in silico de la secuencia de este gen, llegando a la conclusión de que la presencia de este alelo podría inactivar un sitio potencial de ajuste, y así contribuir a una expresión normal de la IL-2. Estos resultados no han sido confirmados por otros autores [153, 177, 203], por lo que es posible que otros factores estén influyendo en dicha expresión.

Con respecto al estudio de haplotipos, al analizar la posible asociación del haplotipo formado por los dos polimorfismos de *IL2* estudiados (-166/330) encontramos asociación estadísticamente significativa del haplotipo TT con el asma atópica, mostrando un modelo de herencia recesivo, especialmente en aquellos individuos sensibilizados a los pólenes, lo que podría suponer su asociación a la respuesta mediada por IgE. Además, el haplotipo TT se encontró asociado, a través de un modelo de herencia recesivo, a la presencia de antecedentes familiares de asma. En este sentido, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Christensen y col.[166], quienes encontraron que este haplotipo se transmitía con mayor frecuencia en individuos con rasgo de atopia, como la dermatitis atópica.

También se encontraron resultados estadísticamente significativos del haplotipo TG con el grupo de asma no atópica, encontrándose éste más representado en los controles que en los individuos con asma no atópica. De nuevo nuestros resultados confirman los obtenidos por Christensen y col. [166], quienes encontraron que este haplotipo se transmitía con menor

frecuencia en individuos alérgicos. Cabe destacar que en los casos que hemos comentado el poder estadístico de nuestro estudio estuvo próximo al 70%.

En el análisis de diplotipos del gen *IL2* (posiciones -330/166) se obtuvo una asociación estadísticamente significativa con distintas características clínico-biológicas. En especial con el diplotipo TT TT, asociado a la presencia de antecedentes familiares de asma, la sensibilización a pólenes, epitelios y la presencia de poliposis. También resultó llamativa la asociación del diplotipo GG GG, que resultó más frecuente en los individuos con intolerancia a antiinflamatorios no esteroideos (32%), frente a controles (10,4%). En todos los casos el poder estadístico superó el 70%.

En función de los resultados obtenidos y descritos hasta el momento, consideramos que los dos polimorfismos de *IL2* incluidos en nuestro estudio pueden ejercer influencia sobre la patología asmática, tanto independientemente como al ser considerados globalmente en forma de haplotipo y diplotipo. Sin embargo, debemos tener en cuenta que esta asociación puede deberse al ligamiento con regiones adyacentes. Así, el gen *IL2* se encuentra físicamente muy próximo al gen que codifica la IL 21, una citocina inmunomoduladora que presenta gran homología con la IL 2 y que, además, se ha asociado al asma atópica en algún estudio [272], por lo que sería interesante examinar este gen en futuros estudios.

## **GEN DE LA INTERLEUCINA 4 Y LA SUBUNIDAD A DE SU RECEPTOR**

La IL-4 es la molécula responsable de la inhibición de moléculas pro-Th1 y de la activación de la producción y secreción de moléculas pro-Th2. Resulta fundamental en el cambio de isotopo de las células B hacia la producción de IgE y, además de potenciarla, induce una sobreexpresión de los receptores para la IgE de baja afinidad en las células inflamatorias presentes en las vías respiratorias [173]. La IL-4 ejerce otros efectos sobre la patología

asmática, como la metaplasia de las células caliciformes, la hipersecreción de moco y el aumento de la expresión de VCAM-1 en las células endoteliales, lo que tiene como consecuencia un mayor reclutamiento de eosinófilos.

La IL-4 es, junto con IL-13, una citocina clave en el desarrollo de la alergia, debido al papel fundamental que desempeña en la inducción de la respuesta de las células Th2 [172], por lo que se trata de un buen gen candidato a ser estudiado. De hecho, es uno de los genes relacionados con el asma y la atopia que más se ha estudiado [63]. Se ha descrito que los polimorfismos -33C>T (rs 2070874), -590 C>T (rs 2243250) y -1098 G>A (rs 2243248) se asocian con los niveles totales de IgE, el asma y otros fenotipos alérgicos en diferentes poblaciones [81, 174-176, 273].

En este estudio no hemos encontrado asociación estadística con los polimorfismos considerados de forma individual. En nuestro grupo de trabajo, en investigaciones previas, habíamos detectado asociación del polimorfismo en posición -33 con el grado de asma [175]; sin embargo, en este estudio no hemos confirmado dicha asociación. No obstante detectamos cierta asociación estadística en el análisis de haplotipos y diplotipos de las posiciones -1098/-590/-33 del gen *IL4*. El haplotipo TCC se encuentra más representado en los individuos con antecedentes familiares de asma y/o enfermedades alérgicas, especialmente en aquellos individuos con antecedentes familiares de asma. Este haplotipo ha sido previamente asociado a la presencia de asma en una población de la India [273], con un tamaño muestral bastante inferior al tratado en este estudio. Destaca también la asociación del haplotipo GTT con la poliposis nasosinusal, debida fundamentalmente a la presencia de dicho haplotipo, en los pacientes si bien el tamaño muestral fue muy pequeño y el poder estadístico no alcanzó el 80%.

Con respecto al estudio de diplotipos, encontramos que la combinación TCC GCC fue significativamente más frecuente en los individuos con intolerancia a los AINE. No obstante, el poder estadístico no alcanzó el 65% lo que podría deberse al pequeño tamaño muestral de pacientes con intolerancia a AINE que han sido incluidos en este estudio.

En este estudio se ha incluido el análisis del polimorfismo en posición 1092 del gen de la subunidad alfa del receptor de la interleucina 4 (*IL 4RA*). Se trata una molécula común a los receptores de IL-4 e IL-13 presentes en las membranas plasmáticas de los linfocitos T acitvados, responsable de la similitud de sus papeles biológicos [179]. Éste polimorfismo (rs1801275) consiste en la sustitución de una A por G, lo que tiene como consecuencia el cambio del aminoácido 576 de glutamina a arginina (Q576R). Éste se ha asociado a una mayor respuesta a la IL-4 en pacientes atópicos [183], así como a la presencia de asma atópica en sujetos de raza blanca [180]. Este polimorfismo había sido previamente estudiado en nuestro grupo de trabajo. Se encontró una asociación de la presencia del arginina en posición 576 con valores de IgE más elevados en pacientes con pruebas cutáneas positivas [174]; sin embargo, al aumentar el número de pacientes estudiados, se perdió dicha significación. En este estudio, en el que se han incluido parte de los individuos de estudios anteriores, no se ha obtenido significación estadística. Esto podría deberse a que la asociación detectada en el primer estudio fuera consecuencia de otros factores genéticos o ambientales que podrían haberse diluido al aumentar el tamaño de la muestra.

## **GEN DE LA INTERLEUCINA 6**

La interleucina 6 (IL-6) es un importante mediador de la respuesta de fase aguda y la inflamación crónica, y ejerce efectos pro- y anti-inflamatorios gracias a la unión con su receptor ( $IL6R\alpha$ ) [184]. Existen estudios que proponen que determinados polimorfismos

presentes en la región promotora del gen de la IL-6 influyen en los niveles de expresión de esta citocina [190], con el consecuente efecto sobre las respuestas inmunológicas mediadas por ésta. Nuestra población de asmáticos presentó una menor frecuencia del alelo C en posición -174 que los controles, lo que podría indicar que la presencia de la mutación podría ejercer un cierto efecto protector en los controles, quizás debido a una disminución en la producción de IL-6. Esta situación se ha confirmado en otros estudios en los que la presencia del alelo C en posición -174 se ha asociado a niveles disminuidos de IL-6 en controles [191, 274] y se ha postulado que la presencia de este polimorfismo produciría cambios en la expresión que provocarían una desregulación de la síntesis de esta citocina, lo que tendría como consecuencia una disminución de la respuesta inflamatoria Th2. Sin embargo, en nuestro estudio el poder estadístico de la asociación no alcanzó un 80%, tampoco para el caso de asma atópica ni de asma persistente, lo que nos hace pensar que sería necesario confirmar esta asociación protectora aumentando el tamaño de la muestra.

En este estudio también se ha detectado una mayor presencia del alelo A del polimorfismo *IL6 nt565 G>A* en los controles que en los pacientes asmáticos, principalmente en pacientes con asma no atópica. Este polimorfismo ha sido previamente asociado a fenómenos inflamatorios como la diabetes tipo I [193] o el síndrome metabólico [275]. El estudio de haplotipos de las posiciones -174nt565 reveló de nuevo una asociación de la combinación de los alelos C en posición -174 y A en posición nt565 con la presencia de asma, ejerciendo un efecto protector y siendo más significativa en el grupo de individuos de asma no atópica. El análisis de ambos SNP, tanto al ser considerados de forma independiente como en forma de haplotipos, presenta cierta tendencia de asociación, que podría estar indicando un ligamiento con algún marcador genético cercano que puede ser el responsable real de la asociación, si bien se necesita la confirmación en población más amplia.

## GEN DE LA INTERLEUCINA 10

La IL-10 es una citocina que desempeña un papel muy importante en la inmunorregulación y la inflamación. La IL-10 inhibe numerosas citocinas asociadas con la inmunidad celular y la alergia, mientras que estimula la respuesta inmune humoral. Se han descritos varios polimorfismos en la región promotora del gen *IL10* que podrían tener relación con los niveles de expresión de esta citocina, entre ellos los tres incluidos en este estudio, en las posiciones -1082 (rs 1800896), -819 (rs 1800871) y -592 (rs 1800872) [194]. En nuestra población hemos encontrado cierta asociación del polimorfismo en posición -1082 con la sensibilización alérgica a los ácaros, observando una mayor presencia del alelo G en los individuos sensibilizados. Los polimorfismos en las posiciones -819 y -592 no mostraron asociación estadísticamente significativa con ningún grupo clínico. El análisis haplotípico mostró resultados débilmente significativos en cuanto a la sensibilización alérgica, si bien dichos resultados no alcanzaron significación estadística suficiente, probablemente debido a la escasa representatividad de los mismos.

Recientes estudios de asociación han encontrado diferencias en la distribución de estos haplotipos entre controles y pacientes con asma [203], lo que sugiere un componente genético en la desregulación de la respuesta inmunitaria mediada por IL-10. Esta desregulación podría explicarse por una expresión de IL-10 variable dependiendo del haplotipo/diplotipo del individuo. En este sentido, Hoffman y cols. [271] llevaron a cabo un estudio de estas posibles diferencias de expresión midiendo los niveles de IL-10 en linfocitos de sangre periférica de pacientes con diferentes genotipos, y encontraron que los diplotipos que combinaban los haplotipos GCC y ACC presentaban distintos grados de producción de IL-10.

En el estudio de diplotipos hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa entre el diplotipo (posiciones -1082/-819/-592) ACC/ATA y la tríada de la aspirina. La asociación de este grupo de polimorfismos con la tríada de la aspirina había sido previamente descrita por Kim y col.[276], quienes encontraron asociación del asma con sensibilización a la aspirina tanto del polimorfismo en posición -1082 de IL 10, como del haplotipo GCC formado por los tres polimorfismos del estudio. Sin embargo éstos investigadores utilizaron como grupo control pacientes asmáticos no sensibilizados a la aspirina. En cualquier caso, tanto los hallazgos de Kim y col., como los obtenidos en nuestro trabajo nos indican la posible influencia de este gen en la sensibilización a la aspirina característica de los pacientes asmáticos.

## **GEN DE LA INTERLEUCINA 12**

La IL-12 es una citocina proinflamatoria que actúa como inductor esencial en el desarrollo de la respuesta Th1, induciendo un aumento en los niveles de IFN- $\gamma$ , suprimiendo, de este modo, la respuesta Th2. Existen varios estudios que muestran la posible influencia de polimorfismos en su región promotora que podrían ser responsables de alteraciones en sus niveles de expresión [210, 277, 278]. En nuestro caso, el estudio del polimorfismo rs3212227 se muestra en concordancia con los resultados de Morahan y col.[83], ya que encontramos una frecuencia significativamente superior del genotipo AC en los pacientes con asma, además de una mayor frecuencia del alelo mutado en dichos pacientes. La asociación del genotipo AC resulta especialmente llamativa en el caso de los pacientes sensibilizados a los ácaros o a los ácaros y pólenes. En el primer caso, se encontró una mayor presencia del alelo mutado en los pacientes, con un poder estadístico superior al 70%. En el análisis genotípico se encontró un mayor número de heterocigotos entre los pacientes, con un poder estadístico del 91,2% y un FPRP de 2,1%. En el caso de los individuos sensibilizados simultáneamente a ácaros y pólenes,

se observó también una mayor proporción del genotipo AC en los pacientes, con un poder algo inferior al de los individuos sensibilizados sólo a ácaros, pero también superior al 80%.

El estudio de Morahan y col. [83] anteriormente citado, que incluye una cohorte de niños asmáticos, sostiene que la presencia del genotipo AC en la posición -1188 del promotor de *IL12B* se asocia, además de a la presencia de asma, a niveles disminuidos de IL-12, además de a una mayor gravedad de la enfermedad. Esta asociación ha sido reproducida en otros estudios [210, 277, 278], aunque los resultados fueron discordantes en el estudio de Siew-Kim y col. [279], en los que no se encontró relación con el asma ni con los niveles de IL-12, aunque sí con los niveles de IgE.

Nuestros resultados son coherentes con la asociación previamente descrita de polimorfismos del promotor de *IL12* y niveles más elevados de IgE [279], lo que podría explicar una mayor sensibilización alérgica de los individuos con este genotipo. Podría ser que, como consecuencia de la presencia de este polimorfismo, se produjese una alteración en la regulación de la expresión de la IL-12 que llevase específicamente a la activación de la respuesta alérgica, con una tendencia a la sensibilización a varios aeroalérgenos de presencia más continuada, como los ácaros.

Como se ha comentado previamente, Morahan y col.[83] asocian la presencia del genotipo heterocigoto en el promotor con la presencia de asma grave. En este sentido, hemos encontrado una mayor proporción de individuos portadores del polimorfismo entre los pacientes que presentaron “asma intermitente”, con un poder estadístico del 70% y un FPRP del 18,7%.



## GEN DEL INTERFERON GAMMA

El interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) o interferón de tipo II es una citocina esencial en la respuesta innata y adaptativa contra infecciones por virus o bacterias intracelulares, así como en el control de tumores. Es también una molécula fundamental en la respuesta adaptativa, gracias a sus efectos inmunoestimuladores e inmunorreguladores.

En nuestro estudio hemos encontrado una asociación del polimorfismo rs2430561 con el asma persistente moderada detectando una mayor proporción del alelo T con respecto a controles, con un poder estadístico que no alcanzó el 70%. Debido al importante papel de esta citocina en la regulación de la respuesta inmune, son numerosos los estudios que se centran en la posible influencia de variantes génicas en la desregulación de dicha respuesta. Recientemente, Hussein y cols. (2009) han estudiado este polimorfismo en pacientes atópicos, encontrando una mayor presencia del genotipo homocigoto mutado (TT) en estos paciente, además de niveles séricos más bajos de IFN- $\gamma$  [217]. Por otro lado se ha relacionado la presencia de 12 repeticiones CA en el VNTR, descrita en posición 1349 del gen *IFNG*, asociada a mayores niveles de expresión génica [214], con diversas enfermedades como la anemia aplásica [215]. Pravica y cols. [216] propusieron que dicha asociación podría ser debida a que el VNTR se encuentra fuertemente ligado a un polimorfismo presente en posición 874A>T (rs2430561), que forma parte de la secuencia de unión del factor de transcripción NFK $\beta$ , por lo que podría ser el responsable de la modificación de la expresión de la proteína. La asociación que hemos detectado en nuestro estudio podría poner de manifiesto la influencia que ejerce este polimorfismo en la producción de IFN- $\gamma$ , o bien reflejar la asociación de algún otro marcador ligado a dicho SNP que podría relacionarse con la manifestación de la patología.

## GEN DEL FACTOR DEL CRECIMIENTO B1

El factor transformador del crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1) es una citocina reguladora que ejerce importantes efectos sobre el epitelio bronquial, estimulando la fibrosis, la formación de la matriz extracelular y la cicatrización [220]. En este sentido, en la patología asmática, esta citocina juega un papel fundamental, ya que interviene en la remodelación bronquial [223], uno de los aspectos fisiopatológicos más importantes en el asma. En la inflamación alérgica, los eosinófilos suponen la principal fuente de TGF- $\beta$ 1 y sus niveles se encuentran aumentados en el lavado broncoalveolar de los pacientes con asma, siendo éste incremento más acentuado tras la exposición a antígenos respiratorios [224].

En este trabajo hemos analizado la posible asociación de dos polimorfismos exónicos, rs1982073 y rs1800471, que afectan respectivamente a los codones c10 y c25. Ambos polimorfismos provocan un cambio de aminoácido en la secuencia proteica, prolina por leucina, en posición 10 (L10P), cambio que ha sido asociado a niveles elevados de traducción de esta citocina [230]; y arginina por prolina en posición 25 (R25P), asociado a una mayor expresión de TGF- $\beta$ 1 en los linfocitos [231]. Ambos han sido asociados a la hiperreactividad bronquial [229] y a la predisposición al asma [232].

A pesar de las numerosas evidencias de la relación de ambos polimorfismos con la patología asmática, en este estudio hemos obtenido una asociación bastante limitada, con unos niveles de significación estadística inferiores a lo que cabía esperar dada su implicación en la patología en el estudio de los polimorfismos aislados. Se encontró cierta asociación del genotipo TC (c10/c25) con la presencia de sensibilización a epitelios, que se mantuvo al ajustar por edad y sexo, a pesar de que la edad ejerció una enorme influencia en el modelo. Sin embargo, en el estudio haplotípico de la combinación de ambos polimorfismos obtuvimos

asociación significativa del haplotipo TG, más abundante en controles que en individuos sensibilizados a hongos, con un poder estadístico del 80% y un FPRP de 9,7% teniendo en cuenta una probabilidad a priori de asociación con la patología del 25%. Estos resultados concuerdan, en parte, por los obtenidos por Mohavedi y col. [203], que también encuentran frecuencias significativamente superiores del haplotipo TG en los controles que en los pacientes con asma. Sin embargo, la población iraní descrita por Mohavedi y cols., no está estudiada en función de su sensibilización alérgica. A pesar de ello, la reiterada asociación de este haplotipo al asma o a alguna característica clínica asociada pone de manifiesto la necesidad de averiguar las bases moleculares de dicha asociación.

Son varios los polimorfismos de este gen en los que se ha estudiado una posible relación con el asma o sus fenotipos asociados entre ellos cabe destacar un polimorfismo presente en la región promotora (posición -590) en el que un cambio de C por T se ha asociado a mayores niveles de transcripción de TGF- $\beta$ 1 [225, 226], a rinosinusitis [227], hiperreactividad bronquial [229] y niveles elevados de IgE [228] pero este polimorfismo no ha sido incluido en este estudio.

## **GEN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA**

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) es una citocina pleiotrópica que interviene en numerosos aspectos inmunológicos. Se trata de una molécula que ejerce un claro efecto proinflamatorio en las vías respiratorias de los individuos asmáticos [280], en las que su expresión se encuentra aumentada [281]. Son numerosos los polimorfismos del gen *TNFA* que han sido estudiados en relación al asma u otras enfermedades de origen inflamatorio. En este estudio, hemos analizado los polimorfismos en posición -308 (G>A) (rs 1800629) y -238 (G>A) (rs 361525).

El análisis del polimorfismo en posición -308 en nuestra población ha mostrado asociaciones muy significativas. Al analizarlo en el global de los pacientes, con el asma como característica común, hemos encontrado cierta asociación del alelo A con esta enfermedad, lo que está en consonancia con lo descrito en la bibliografía [254-256, 282]. Al diferenciar entre pacientes con asma atópica y no atópica, encontramos una mayor frecuencia del alelo A en los individuos atópicos, aunque con un poder estadístico inferior al 80%. Sin embargo, si tenemos en cuenta el alérgeno responsable de la sensibilización, encontramos que los individuos sensibles a pólenes y ácaros presentan una asociación mucho más significativa, con un poder estadístico del 82,5% y una FPRP de 3,4%. Estos resultados son muy interesantes, ya que describen como el determinar fenotípicamente las características clínicas de los individuos puede permitir acotar el efecto de un determinado polimorfismo en la patología. La relación del polimorfismo en posición -308 y la atopia ha sido analizada en varios estudios, algunos de los cuales encuentran asociación [283] y otros no [100, 284, 285]. Esta diversidad en los resultados puede tener muchas causas, la más probable es la mala replicación que generalmente presentan los estudios de asociación, debido a las diferencias entre poblaciones, sin descartar el posible efecto de factores ambientales. En este caso, puede deberse a diferencias en la caracterización de la atopia. En el estudio de Louis y col.[284], los autores caracterizan la población atópica como positividad de pruebas cutáneas, en el de Moffat y col.[100] como niveles alterados de IgE total y en la de Shin y col. [285] como positividad de pruebas cutáneas o niveles elevados de IgE específica frente a *D. farinae* y *D. pteronyssinus*. Como se ha comentado anteriormente, si analizamos nuestra población teniendo en cuenta únicamente si los individuos son o no atópicos, igual que hacen en los estudios anteriormente citados, obtendríamos una significación muy pobre. Sin embargo, al caracterizar la población en función del aeroalérgeno observamos que la polisensibilización podría ser un factor importante y conseguimos acotar la posible causa de la asociación.

La presencia del alelo A en posición -308 ha sido relacionada tanto con los niveles de expresión del *TNFA* [243, 251, 252], como con los de secreción del  $TNF\alpha$  [286]. Este polimorfismo también ha sido ligado a la presencia de asma en numerosos estudios. Winchester y col. (2000) [253] concluyen que la presencia del alelo A podría ser un factor de riesgo genético en el desarrollo de asma infantil. En un artículo publicado en 2005, Randolph y col. [282] hacen una revisión en la que se resumen los estudios que han analizado este polimorfismo en poblaciones con asma y/o alergia, describiendo mayoritariamente una asociación del alelo A y el asma. Otros estudios apoyan estas conclusiones [254-256].

El polimorfismo -238 se ha asociado con enfermedades de componente inflamatorio variable. El genotipo GA parece ser un factor influyente en la supervivencia de los pacientes con fibrosis quística [257]. En los pacientes con colitis ulcerosa, la presencia del alelo mutado (A) en la posición -238 del gen de  $TNF\alpha$  se ha asociado con baja producción de  $TNF\alpha$  [258]. Recientemente, se ha determinado que el alelo G en posición -238 forma parte de una isla de metilación CpG, que podría modular la tasa de transcripción del *TNFA* [287], de manera que una mutación en ese nucleótido tendría como consecuencia una desregulación de la expresión de la citocina.

El análisis estadístico del haplotipo formado por la combinación de polimorfismos de las posiciones -308 y -238 mostró resultados significativos similares a los obtenidos en el análisis de frecuencias genotípicas. Detectamos que la presencia del haplotipo AG (-308/-238 del *TNFA*) resultó ser más frecuente en los pacientes, con mayor o menor grado de poder estadístico en función del grupo clínico considerado. Además, detectamos un modelo de herencia de este haplotipo dominante en pacientes. La significación de este haplotipo resultó especialmente llamativa en individuos sensibilizados a pólenes y ácaros, con un poder estadístico del 83% y un FPRP de 4,8%. La similitud de resultados entre en análisis del alelo A

en posición -308 y el análisis haplotípico pueden deberse a que el efecto encontrado en la combinación sea consecuencia del ligamiento existente entre los dos *loci*.

Por otro lado, encontramos una asociación significativa del haplotipo GG, más representado en los controles que en los individuos sensibilizados a pólenes (poder estadístico de 82,1%, FPRP de 6,7%) y ácaros y pólenes (poder estadístico de 92,2%, FPRP de 4,7). Este haplotipo, en el que no se encuentra ningún alelo mutado, conferiría a los individuos portadores menor riesgo de padecer la enfermedad y mostró un modelo de herencia recesivo. De nuevo, la significación se asocia con la sensibilidad a ácaros y a pólenes pero en este caso, a diferencia del anterior, es más significativa la asociación del haplotipo no mutado al comparar con los individuos sensibilizados a pólenes, al contrario que el haplotipo AG mutado, en el que encontramos una asociación más potente con la sensibilidad a ácaros.

El análisis de diplotipos concuerda, con esta hipótesis, ya que se encuentra que el diplotipo GG GG (posiciones -308/-238) es más frecuente en controles que en individuos sensibilizados a más de un aeroalérgeno, con un poder estadístico superior al 80%.

Además de la asociación del haplotipo formado por ambos polimorfismos a la sensibilización alérgica y al igual que en el estudio de frecuencias alélicas y genotípicas, se encontró una asociación con la tríada de la aspirina. Los individuos con estas características clínicas presentaron una proporción significativamente menor del haplotipo GG y el diplotipo GG GG que los controles, con un poder estadístico cercano al 80%.

El análisis de la gravedad de asma en nuestros pacientes, en los que un 11,87% presentaban asma grave según los criterios de la GINA, encontramos una mayor presencia del alelo A en posición -308 del gen *TNFA* respecto a controles. Esta asociación resultó ser más significativa al agrupar a los individuos con mayor grado de gravedad, (con asma moderada y

los que presentaron asma grave), encontrándose, de nuevo, una mayor representación del alelo A. Algo similar ocurrió al analizar el haplotipo formado por los polimorfismos -308/-238, se encontró una asociación significativa del haplotipo AG con el asma grave y el poder de esta asociación se incrementó al incluir el grupo de individuos con asma moderada.

Lo mismo se encontró en el análisis de diplotipos, en el que el diplotipo AG GG fue más frecuente en pacientes, con un poder superior al tener en cuenta a los individuos con asma grave y asma moderada (poder de 80,5% y FPRP de 8,7%) que al analizar únicamente individuos con asma grave (poder de 70,3% y FPRP de 17,2%). Como ya se ha comentado, los niveles de factor de necrosis tumoral alfa se encuentran aumentados en pacientes con asma [281]. Esto se hace especialmente patente en individuos con asma grave, en los que se han detectado niveles de TNF- $\alpha$  significativamente superiores a los de los individuos con grados de asma más leves [288], lo que explicaría la mejor respuesta al tratamiento con medicación antagonista al TNF- $\alpha$  [288]. Se ha demostrado que en los pacientes con asma grave existe un aumento en la liberación de esta proteína, encontrándose expresión elevada de TNF- $\alpha$ , del TNFR1 (receptor mediante el que la molécula ejerce su actividad) y de la enzima convertidora del TNF- $\alpha$ [289]. Berry y col. han propuesto que esto podría deberse a la coexistencia del asma con otras patologías inflamatorias que incrementasen la actividad del TNF- $\alpha$  o a variaciones en el gen que codifica esta citocina o alguna de las moléculas que participan en su procesamiento y liberación. La asociación reiterativa del polimorfismo en posición -308 con la gravedad del asma podría indicar que este polimorfismo forma parte de la base genética propuesta en función de las características observadas en la práctica clínica diaria.

## **COMBINACIONES GÉNICAS**

En este estudio se han analizado 22 polimorfismos de 13 genes diferentes. En este trabajo hemos intentado hacer una aproximación estadística al estudio multifactorial combinado, intentando analizar los 22 polimorfismos simultáneamente, con la finalidad de encontrar las combinaciones génicas más significativas. Como se ha comentado anteriormente, hemos utilizado un novedoso algoritmo de reducción multidimensional, MDR, [290-293]. Se trata de un algoritmo muy complejo que analiza las diferentes variables y en función de las mismas, crea atributos y los organiza en combinaciones de “alto riesgo” y “bajo riesgo”, asignado a cada una de ellas una fiabilidad y una significación estadística determinada.

Debido a la complejidad técnica del análisis, hemos realizado únicamente comparaciones entre controles y pacientes con asma atópica, y controles y pacientes con asma no atópica. No hemos comparado el grupo asma de forma global porque hemos querido restringir las características clínicas de los pacientes, con la finalidad de encontrar combinaciones más fiables. Del estudio de las combinaciones génicas hemos detectado algunas combinaciones especialmente significativas; sin embargo a medida que aumenta el número de SNP que se combinan simultáneamente, el número de pacientes que se detectan en cada grupo va disminuyendo. Esto genera múltiples combinaciones con escaso número de pacientes lo que dificulta la detección de posibles marcadores génicos predictivos.

La combinación génica en la que se encontraron las diferencias más llamativas entre controles y pacientes con asma alérgica resultó ser la formada por los polimorfismos *TGFβc10*, *TGFβc25*, *IL2 -330* y *IL6 -174* (con una probabilidad de error del 34,99%), en la que todos los individuos que presentaban la combinación CC GG TT CG eran pacientes con asma atópica. En



el caso de los pacientes con asma no atópica destacó como especialmente llamativa la combinación formada por los SNP *IL1B -511*, *TGFB1 c10*, *IL2 166* y *IL10 -1082*, con un error de predicción del 28,77%, en la que todos los individuos que presentaban la combinación CC TC GG AG eran controles.

Si bien la mayoría de los polimorfismos detectados con el sistema MDR no presentaban asociación con la enfermedad cuando se analizaron de forma aislada, el análisis combinado de todos los polimorfismos proporciona una información muy interesante. En nuestro caso ha permitido detectar combinaciones específicas que sólo aparecen en un grupo clínico. El problema fundamental de esta aproximación como se ha comentado previamente es que a medida que aumenta el número de SNP que se analizan simultáneamente disminuye, lógicamente, el número de individuos que portan dichas combinaciones. En este estudio el aspecto del tamaño muestral ha sido tenido en cuenta de manera muy especial. En el diseño inicial se realizó un cálculo aproximado basado en las frecuencias descritas en la bibliografía. Posteriormente, cuando se llevaba completada aproximadamente la mitad del estudio, se realizó un exhaustivo análisis estadístico y se recalculó el tamaño muestral. Esta aproximación ha permitido que las asociaciones estadísticas más concluyentes presenten poderes estadísticos superiores al 80% y tasa bajas de FPRP. Sin embargo, en el estudio simultáneo de múltiples polimorfismos, el escaso del número de pacientes portadores de combinaciones complejas hace necesaria la confirmación de los resultados de asociación en grupos poblacionales mucho más amplios.

Como se ha citado previamente el asma es una enfermedad multifactorial en la que tenemos que tener en cuenta no solo los factores genéticos sino también los ambientales. Una gran parte de la complejidad de la enfermedad se refleja en las asociaciones génicas

detectadas. En este estudio hemos puesto de manifiesto algunos de los aspectos relevantes de las asociaciones génicas y sus implicaciones en el asma.

# CONCLUSIONES

---





## 7. CONCLUSIONES

1. En este estudio se han caracterizado múltiples polimorfismos de genes que codifican citocinas. Las principales asociaciones génicas detectadas entre los polimorfismos analizados y las características clínico-biológicas han sido las correspondientes a polimorfismos ubicados en los genes de la interleucina 12 (*IL12B*), del Factor de Necrosis Tumoral alfa (*TNFA*) y de la interleucina 1 (*IL1B*).
2. La mayoría de los polimorfismos que han presentado las asociaciones génicas más evidentes se localizan en regiones promotoras, lo que permite postular que el mecanismo subyacente implicado podría estar relacionado con el control de la expresión de estos genes.
3. En relación con el tipo de asma, los polimorfismos *IL12B* -1188, *TNFA* -308 e *IL1B* 3962 parecen conferir una mayor susceptibilidad a desarrollar asma atópica. Este efecto es especialmente notorio en los pacientes que presentan polisensibilización a aeroalérgenos.
4. El polimorfismo -330 del gen de la interleucina 2 parece asociarse con un riesgo incrementado de desarrollar asma no atópica. Esta asociación se manifiesta de modo especial en el caso de los pacientes con tríada del AAS.
5. En relación con la gravedad de asma, el polimorfismo *TNFA* -308 parece conferir a los pacientes con asma un mayor riesgo de presentar asma persistente grave.

6. Los polimorfismos del gen *IL6* (-174 y nt565) son el único caso de este estudio en el que se ha observado un carácter protector del alelo mutado, en el análisis individualizado de asociación génica de polimorfismos.
7. El estudio de los haplotipos y diplotipos ha confirmado los resultados del análisis individualizado, en concreto para la gravedad de asma y para la condición de polisensibilización en el asma atópica en el caso de los genes *IL1B* y *TNFA*.
8. El estudio de las combinaciones génicas ha proporcionado una información más completa que la derivada del análisis individualizado de los polimorfismos. Aunque no se puede afirmar categóricamente, por razones de tamaño muestral, que determinadas combinaciones génicas ejerzan un efecto protector o deletéreo, ciertas combinaciones sólo se han detectado en un determinado grupo clínico. Este teórico carácter predictivo deberá ser confirmado en poblaciones más amplias.

# BIBLIOGRAFÍA

---







## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. National Institutes of Health.National Heart, L.a.B.I., *Global Initiative for Asthma: Global strategy for asthma management and prevention*. [www.ginasthma.com](http://www.ginasthma.com), 2008 (update).
2. Zhang, J., P.D. Pare, and A.J. Sandford, *Recent advances in asthma genetics*. *Respir Res*, 2008. **9**: p. 4.
3. Asher, M., et al., *International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods*. *Eur Respir J*, 1995. **8**(3): p. 483-491.
4. Yawn, B.P., *Asthma screening, case identification and treatment in school-based programs*. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 2006. **12**(1): p. 23-27.
5. Sirvent J, G.P.-Y.E., *Fisiopatología, diagnóstico y evaluación del paciente asmático.*, in *Tratado de Neumología Infantil*, N.a.G.P.-Y. Cobos, Editor. 2003. p. 577-598.
6. Masoli, M., et al., *The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report*. *Allergy*, 2004. **59**(5): p. 469-478.
7. Europe, W.H.O.R.O.f. *European Mortality Database*. June 2005 2010 <http://data.euro.who.int/hfamdb/>.
8. Weiss, K.B. and S.D. Sullivan, *The economic costs of asthma: a review and conceptual model*. *Pharmacoeconomics*, 1993. **4**(1): p. 14-30.
9. Busse, W.W. and R.F. Lemanske, *Asthma*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(5): p. 350-362.
10. Denise, G.W., A.M. Deborah, and R.B. Eugene, *Genetics of asthma*. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 1999. **104**(5): p. 895-901.
11. Stephanie, A.S. and J.F. Jeffrey, *Obesity, smooth muscle, and airway hyperresponsiveness*. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2005. **115**(5): p. 925-927.
12. Horwood, L.J., D.M. Fergusson, and F.T. Shannon, *Social and familial factors in the development of early childhood asthma*. *Pediatrics*, 1985. **75**(5): p. 859-68.
13. Burrows, B., et al., *Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens*. *N Engl J Med*, 1989. **320**(5): p. 271-7.

14. Sears, M.R., et al., *The relative risks of sensitivity to grass pollen, house dust mite and cat dander in the development of childhood asthma*. Clin Exp Allergy, 1989. **19**(4): p. 419-24.
15. Prescott, S.L., et al., *Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile*. J Immunol, 1998. **160**(10): p. 4730-7.
16. Andrew, H.L. and J.S. Stanley, *Advances in childhood asthma: Hygiene hypothesis, natural history, and management*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2003. **111**(3): p. S785-S792.
17. Bjorksten, B., et al., *Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(4): p. 516-20.
18. Andrew, H.L., *Endotoxin exposure in allergy and asthma: Reconciling a paradox*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2002. **109**(3): p. 379-392.
19. Lemanske, R.F., Jr. and W.W. Busse, *6. Asthma: Factors underlying inception, exacerbation, and disease progression*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(2 Suppl Mini-Primer): p. S456-61.
20. Kraft, M., et al., *Detection of Mycoplasma pneumoniae in the Airways of Adults with Chronic Asthma*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1998. **158**(3): p. 998-1001.
21. Cook, P.J., et al., *Chlamydia pneumoniae and asthma*. Thorax, 1998. **53**(4): p. 254-259.
22. Macaubas, C., et al., *Association between antenatal cytokine production and the development of atopy and asthma at age 6 years*. The Lancet, 2003. **362**(9391): p. 1192-1197.
23. Barnes, N.C., *Can Guideline-defined Asthma Control Be Achieved?: The Gaining Optimal Asthma Control Study*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2004. **170**(8): p. 830-831.
24. *What Constitutes an Adverse Health Effect of Air Pollution? . 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**(2): p. 665-673.
25. Knox, R.B., et al., *Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution*. Clin Exp Allergy, 1997. **27**(3): p. 246-51.
26. Behrendt, H. and W.M. Becker, *Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(6): p. 709-15.
27. Graham, D. and S. Anthony, *Diet as a risk factor for atopy and asthma*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2005. **115**(6): p. 1109-1117.
28. Cohn, L., J.A. Elias, and G.L. Chupp, *Asthma: Mechanisms of Disease Persistence and Progression*. Annual Review of Immunology, 2004. **22**(1): p. 789-815.

29. Peter, B., F.W. Andrew, and T.H. Stephen, *The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2006. **117**(6): p. 1277-1284.
30. Galli, S.J., et al., *Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 749-86.
31. Rothenberg, M.E. and S.P. Hogan, *The eosinophil*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 147-74.
32. Wardlaw, A.J., *Molecular basis for selective eosinophil trafficking in asthma: A multistep paradigm*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**(5): p. 917-26.
33. Kay, A.B., *The role of T lymphocytes in asthma*. Chem Immunol Allergy, 2006. **91**: p. 59-75.
34. Holt, P.G. and J.W. Upham, *The role of dendritic cells in asthma*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2004. **4**(1): p. 39-44.
35. Adkinson F, B.B., Busse W, Holgate S, Lemanske R, Simons F., *Middleton's Allergy: Principles & Practice*. 7th Edition ed. 2009.
36. Peters-Golden, M., *The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **31**(1): p. 3-7.
37. Menard, G. and E.Y. Bissonnette, *Priming of alveolar macrophages by leukotriene D(4): potentiation of inflammation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **23**(4): p. 572-7.
38. Jatakanon, A., et al., *Neutrophilic Inflammation in Severe Persistent Asthma*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1999. **160**(5): p. 1532-1539.
39. Sur, S., et al., *Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa?* Am Rev Respir Dis, 1993. **148**(3): p. 713-9.
40. Wenzel, S., *Mechanisms of severe asthma*. Clinical & Experimental Allergy, 2003. **33**(12): p. 1622-1628.
41. Bogaert, P., et al., *Where Asthma and Hypersensitivity Pneumonitis Meet and Differ: Noneosinophilic Severe Asthma*. Am J Pathol, 2009. **174**(1): p. 3-13.
42. Robinson, D.S., *The role of the T cell in asthma*. J Allergy Clin Immunol. **126**(6): p. 1081-91.
43. Barnes, P.J., K.F. Chung, and C.P. Page, *Inflammatory Mediators of Asthma: An Update*. Pharmacol Rev, 1998. **50**(4): p. 515-596.
44. Allison, L.M. and W.L. Nicholas, *Chemokine receptors: understanding their role in asthmatic disease*. Immunology and allergy clinics of North America, 2004. **24**(4): p. 667-683.

45. Leff, A.R., *Regulation of leukotrienes in the management of asthma: biology and clinical therapy*. Annu Rev Med, 2001. **52**: p. 1-14.
46. Ricciardolo, F.L., et al., *Nitric oxide in health and disease of the respiratory system*. Physiol Rev, 2004. **84**(3): p. 731-65.
47. Smith, A.D. and D.R. Taylor, *Is exhaled nitric oxide measurement a useful clinical test in asthma?* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2005. **5**(1): p. 49-56.
48. Oguma, T., K. Asano, and A. Ishizaka, *Role of prostaglandin D(2) and its receptors in the pathophysiology of asthma*. Allergol Int, 2008. **57**(4): p. 307-12.
49. Johnson, S.R. and A.J. Knox, *Synthetic functions of airway smooth muscle in asthma*. Trends Pharmacol Sci, 1997. **18**(8): p. 288-92.
50. Hargreave, F.E., et al., *Bronchial responsiveness to histamine or methacholine in asthma: measurement and clinical significance*. J Allergy Clin Immunol, 1981. **68**(5): p. 347-55.
51. Boulet, L.-P., *Physiopathology of airway hyperresponsiveness*. Current Allergy and Asthma Reports, 2003. **3**(2): p. 166-171.
52. Benayoun, L., et al., *Airway Structural Alterations Selectively Associated with Severe Asthma*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2003. **167**(10): p. 1360-1368.
53. Cho, S.H., et al., *Pathological changes according to the severity of asthma*. Clin Exp Allergy, 1996. **26**(10): p. 1210-9.
54. Jeffery, P.K., *Remodeling in Asthma and Chronic Obstructive Lung Disease*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2001. **164**(10): p. S28-38.
55. ORDONEZ, C.L., et al., *Mild and Moderate Asthma Is Associated with Airway Goblet Cell Hyperplasia and Abnormalities in Mucin Gene Expression*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2001. **163**(2): p. 517-523.
56. Busse, W., et al., *Airway Remodeling and Repair*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1999. **160**(3): p. 1035-1042.
57. Cooke, R.A. and A.V. Veer, Jr., *Human Sensitization*. J Immunol, 1916. **1**(3): p. 201-305.
58. Drinkwater, H., *An Address on recent theories and experiments on heredity and inheritance: Delivered before the Denbigh and Flint Division of the British Medical Association*. Br Med J, 1908. **2**(2499): p. 1538-1541.
59. Rackemann, F.M., *Studies in asthma II: An analysis of two hundred and thirteen cases in which the patients were relieved for more than two years*. Arch Intern Med, 1928. **41**(3): p. 346-369.
60. Spain, W.C. and R.A. Cooke, *Studies in Specific Hypersensitiveness: XI. The Familial Occurrence of Hay Fever and Bronchial Asthma*. J Immunol, 1924. **9**(6): p. 521-569.

61. Los, H., P.E. Postmus, and D.I. Boomsma, *Asthma genetics and intermediate phenotypes: a review from twin studies*. *Twin Res*, 2001. **4**(2): p. 81-93.
62. Kumar, A. and B. Ghosh, *Genetics of asthma: a molecular biologist perspective*. *Clinical and Molecular Allergy*, 2009. **7**(1): p. 7.
63. Vercelli, D., *Discovering susceptibility genes for asthma and allergy*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(3): p. 169-82.
64. Ober, C. and S. Hoffjan, *Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery*. *Genes Immun*, 2006. **7**(2): p. 95-100.
65. Risch, N. and K. Merikangas, *The future of genetic studies of complex human diseases*. *Science*, 1996. **273**(5281): p. 1516-7.
66. Carlson, C.S., et al., *Mapping complex disease loci in whole-genome association studies*. *Nature*, 2004. **429**(6990): p. 446-52.
67. *Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls*. *Nature*, 2007. **447**(7145): p. 661-78.
68. Vercelli, D. and F.D. Martinez, *The Faustian bargain of genetic association studies: bigger might not be better, or at least it might not be good enough*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **117**(6): p. 1303-5.
69. Williams, S.M., et al., *Problems with genome-wide association studies*. *Science*, 2007. **316**(5833): p. 1840-2.
70. Hoffjan, S., D. Nicolae, and C. Ober, *Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature*. *Respiratory Research*, 2003. **4**(1): p. 14.
71. Baldini, M., et al., *A Polymorphism\* in the 5' Flanking Region of the CD14 Gene Is Associated with Circulating Soluble CD14 Levels and with Total Serum Immunoglobulin E*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1999. **20**(5): p. 976-983.
72. Leung, T.F., et al., *CD14 and toll-like receptors: potential contribution of genetic factors and mechanisms to inflammation and allergy*. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005. **4**(2): p. 169-75.
73. Hysi, P., et al., *NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma*. *Hum. Mol. Genet.*, 2005. **14**(7): p. 935-941.
74. Rosenstiel, P., A. Till, and S. Schreiber, *NOD-like receptors and human diseases*. *Microbes and Infection*, 2007. **9**(5): p. 648-657.
75. Hong, J., et al., *TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2007. **22**(11): p. 1760-1766.
76. Arroyo-Espliguero, R., et al., *CD14 and toll-like receptor 4: a link between infection and acute coronary events?* *Heart*, 2004. **90**(9): p. 983-988.

77. Hobbs, K., et al., *Interleukin-10 and Transforming Growth Factor-beta Promoter Polymorphisms in Allergies and Asthma*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1998. **158**(6): p. 1958-1962.
78. Litonjua, A., et al., *Polymorphisms in signal transducer and activator of transcription 3 and lung function in asthma*. Respiratory Research, 2005. **6**(1): p. 52.
79. Shiina, T., H. Inoko, and J.K. Kulski, *An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004*. Tissue Antigens, 2004. **64**(6): p. 631-649.
80. Pykäläinen, M., et al., *Association analysis of common variants of STAT6, GATA3, and STAT4 to asthma and high serum IgE phenotypes*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2005. **115**(1): p. 80-87.
81. Basehore, M.J., et al., *A comprehensive evaluation of IL4 variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2004. **114**(1): p. 80-87.
82. Loza, M.J. and B.L. Chang, *Association between Q551R IL4R genetic variants and atopic asthma risk demonstrated by meta-analysis*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(3): p. 578-85.
83. Morahan, G., et al., *Association of IL12B promoter polymorphism with severity of atopic and non-atopic asthma in children*. Lancet, 2002. **360**(9331): p. 455-9.
84. Wills-Karp, M., et al., *Interleukin-13: central mediator of allergic asthma*. Science, 1998. **282**(5397): p. 2258-61.
85. Dealtry, G.B., et al., *Expression and localization of the Th2-type cytokine interleukin-13 and its receptor in the placenta during human pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 1998. **40**(4): p. 283-90.
86. Ribeiro-do-Couto, L.M., et al., *High IL-13 production by human neonatal T cells: neonate immune system regulator?* Eur J Immunol, 2001. **31**(11): p. 3394-402.
87. Vladich, F.D., et al., *IL-13 R130Q, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector mechanisms essential for human allergic inflammation*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 747-54.
88. Cameron, L., et al., *Th2 cell-selective enhancement of human IL13 transcription by IL13-1112C>T, a polymorphism associated with allergic inflammation*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8633-42.
89. Shirakawa, T., et al., *Association between atopy and variants of the beta subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor*. Nat Genet, 1994. **7**(2): p. 125-9.
90. Kabesch, M., et al., *Polymorphisms in eosinophil pathway genes, asthma and atopy*. Allergy, 2007. **62**(4): p. 423-8.
91. Johansson, S., et al., *Clara cell 16-kd protein downregulates T(H)2 differentiation of human naive neonatal T cells*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(2): p. 308-14.

92. Nickel, R.G., et al., *Atopic dermatitis is associated with a functional mutation in the promoter of the C-C chemokine RANTES*. J Immunol, 2000. **164**(3): p. 1612-6.
93. Levy, H., et al., *Association of defensin beta-1 gene polymorphisms with asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(2): p. 252-8.
94. Sengler, C., et al., *Clara cell protein 16 (CC16) gene polymorphism influences the degree of airway responsiveness in asthmatic children*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(3): p. 515-9.
95. Walley, A.J., et al., *Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease*. Nat Genet, 2001. **29**(2): p. 175-8.
96. Ying, S., et al., *Lack of filaggrin expression in the human bronchial mucosa*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(6): p. 1386-8.
97. Palmer, C.N., et al., *Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis*. Nat Genet, 2006. **38**(4): p. 441-6.
98. Palmer, C.N., et al., *Filaggrin null mutations are associated with increased asthma severity in children and young adults*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(1): p. 64-8.
99. Silverman, E.K., et al., *Family-based association analysis of [beta]2-adrenergic receptor polymorphisms in the childhood asthma management program*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2003. **112**(5): p. 870-876.
100. Moffatt, M.F. and W.O. Cookson, *Tumour necrosis factor haplotypes and asthma*. Hum Mol Genet, 1997. **6**(4): p. 551-4.
101. Arriba-Mendez, S., et al., *Analysis of 927T > C CYSLTR1 and -444A > C LTC4S polymorphisms in children with asthma*. Allergol Immunopathol (Madr), 2008. **36**(5): p. 259-63.
102. Kabesch, M., et al., *Glutathione S transferase deficiency and passive smoking increase childhood asthma*. Thorax, 2004. **59**(7): p. 569-73.
103. Shin, H.D., et al., *Association of thromboxane A2 receptor (TBXA2R) with atopy and asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(2): p. 454-7.
104. Drazen, J.M., et al., *Pharmacogenetic association between ALOX5 promoter genotype and the response to anti-asthma treatment*. Nat Genet, 1999. **22**(2): p. 168-70.
105. Matsuda, A., et al., *Coding SNP in tenascin-C Fn-III-D domain associates with adult asthma*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(19): p. 2779-86.
106. Gao, P.S., et al., *Variants of NOS1, NOS2, and NOS3 genes in asthmatics*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **267**(3): p. 761-3.
107. Hall, I.P. and I. Sayers, *Pharmacogenetics and asthma: false hope or new dawn?* Eur Respir J, 2007. **29**(6): p. 1239-1245.

108. Van Eerdewegh, P., et al., *Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness*. *Nature*, 2002. **418**(6896): p. 426-430.
109. Holgate, S.T., et al., *Local genetic and environmental factors in asthma disease pathogenesis: chronicity and persistence mechanisms*. *Eur Respir J*, 2007. **29**(4): p. 793-803.
110. Mellor, J., *It Takes a PHD to Read the Histone Code*. *Cell*, 2006. **126**(1): p. 22-24.
111. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma*. *Nat Genet*, 2003. **34**(2): p. 181-6.
112. Allen, M., et al., *Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14*. *Nat Genet*, 2003. **35**(3): p. 258-63.
113. Laitinen, T., et al., *Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits*. *Science*, 2004. **304**(5668): p. 300-4.
114. Noguchi, E., et al., *Positional Identification of an Asthma Susceptibility Gene on Human Chromosome 5q33*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2005. **172**(2): p. 183-188.
115. Balaci, L., et al., *IRAK-M Is Involved in the Pathogenesis of Early-Onset Persistent Asthma*. *The American Journal of Human Genetics*, 2007. **80**(6): p. 1103-1114.
116. Moffatt, M.F., et al., *Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma*. *Nature*, 2007. **448**(7152): p. 470-473.
117. Hjelmqvist, L., et al., *ORMDL proteins are a conserved new family of endoplasmic reticulum membrane proteins*. *Genome Biology*, 2002. **3**(6): p. research0027.1 - research0027.16.
118. Weidinger, S., et al., *Genome-wide scan on total serum IgE levels identifies FCER1A as novel susceptibility locus*. *PLoS Genet*, 2008. **4**(8): p. e1000166.
119. Imada, Y., et al., *Large scale genotyping study for asthma in the Japanese population*. *BMC Research Notes*, 2009. **2**(1): p. 54.
120. Upton, M.N., et al., *Intergenerational 20 year trends in the prevalence of asthma and hay fever in adults: the Midspan family study surveys of parents and offspring*. *BMJ*, 2000. **321**(7253): p. 88-92.
121. Ptak, C. and A. Petronis, *Epigenetics and Complex Disease: From Etiology to New Therapeutics*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2008. **48**(1): p. 257-276.
122. Roses, A.D., *Pharmacogenetics and the practice of medicine*. *Nature*, 2000. **405**(6788): p. 857-865.
123. Szalai, C., et al., *Asthma from a pharmacogenomic point of view*. *Br J Pharmacol*, 2008. **153**(8): p. 1602-14.



124. Drysdale, C.M., et al., *Complex promoter and coding region beta 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(19): p. 10483-8.
125. Liggett, S.B., *Polymorphisms of adrenergic receptors: variations on a theme*. Assay Drug Dev Technol, 2003. **1**(2): p. 317-26.
126. Duroudier, N.P., A.S. Tulah, and I. Sayers, *Leukotriene pathway genetics and pharmacogenetics in allergy*. Allergy, 2009. **64**(6): p. 823-839.
127. Drazen, J.M., E.K. Silverman, and T.H. Lee, *Heterogeneity of therapeutic responses in asthma*. Br Med Bull, 2000. **56**(4): p. 1054-1070.
128. Sanak, M., H.U. Simon, and A. Szczeklik, *Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism and risk of aspirin-induced asthma*. Lancet, 1997. **350**(9091): p. 1599-600.
129. Palmer, L.J., et al., *Pharmacogenetics of asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(7): p. 861-6.
130. Crowley, S., *Inhaled glucocorticoids and adrenal function: an update*. Paediatric Respiratory Reviews, 2003. **4**(2): p. 153-161.
131. Tantisira, K.G., et al., *Corticosteroid pharmacogenetics: association of sequence variants in CRHR1 with improved lung function in asthmatics treated with inhaled corticosteroids*. Hum. Mol. Genet., 2004. **13**(13): p. 1353-1359.
132. Dinarello, C.A., *Interleukin-1*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 1997. **8**(4): p. 253-265.
133. Rubartelli, A., et al., *A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence*. EMBO J, 1990. **9**(5): p. 1503-10.
134. Dinarello, C., *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2095-2147.
135. Kim, S.H., et al., *Association of -31T>C and -511 C>T polymorphisms in the interleukin 1 beta (IL1B) promoter in Korean keratoconus patients*. Mol Vis, 2008. **14**: p. 2109-16.
136. Kornman, K.S., et al., *The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease*. Journal of Clinical Periodontology, 1997. **24**(1): p. 72-77.
137. Rogers, J., *An IL-1{alpha} susceptibility polymorphism in Alzheimer's disease: New fuel for the inflammation hypothesis*. Neurology, 2000. **55**(4): p. 464-465.
138. Kolsch, H., et al., *Gene polymorphisms of interleukin-1alpha influence the course of Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 2001. **49**(6): p. 818-9.
139. Karjalainen, J., V-P. Joki-Erkkilä, J. Hulkkonen, T. Pessi, M. M. Nieminen, A. Aromaa, T. Klaukka, M. Hurme., *The IL1A genotype is associated with nasal polyposis in asthmatic adults*. Allergy, 2003. **58**(5): p. 393-396.

140. Erbek, S.S., et al., *Proinflammatory Cytokine Single Nucleotide Polymorphisms in Nasal Polyposis*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2007. **133**(7): p. 705-709.
141. Arend, W.P., *Interleukin-1 receptor antagonist*. Adv Immunol, 1993. **54**: p. 167-227.
142. Settin, A., et al., *Gene polymorphisms of TNF-alpha-308 (G/A), IL-10(-1082) (G/A), IL-6(-174) (G/C) and IL-1Ra (VNTR) in Egyptian cases with type 1 diabetes mellitus*. Autoimmunity, 2009. **42**(1): p. 50-5.
143. Settin, A., et al., *Gene polymorphisms of IL-6(-174) G/C and IL-1Ra VNTR in asthmatic children*. Indian J Pediatr, 2008. **75**(10): p. 1019-23.
144. Zeyrek, D., et al., *Association of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in Turkish children with atopic asthma*. Allergy Asthma Proc, 2008. **29**(5): p. 468-74.
145. Pattaro, C., et al., *Association between interleukin-1 receptor antagonist gene and asthma-related traits in a German adult population*. Allergy, 2006. **61**(2): p. 239-44.
146. Tsai, L.J., et al., *The different expression patterns of interleukin-1 receptor antagonist in systemic lupus erythematosus*. Tissue Antigens, 2006. **68**(6): p. 493-501.
147. Abazis-Stamboulieh, D., et al., *Association of interleukin-1A, interleukin-1B and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms with multiple myeloma*. Leuk Lymphoma, 2007. **48**(11): p. 2196-203.
148. Dale, M. and M.J.H. Nicklin, *Interleukin-1 Receptor Cluster: Gene Organization of IL1R2, IL1R1, IL1RL2(IL-1Rrp2), IL1RL1(T1/ST2), and IL18R1(IL-1Rrp)* on Human Chromosome 2q. Genomics, 1999. **57**(1): p. 177-179.
149. Martin, M.U. and H. Wesche, *Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2002. **1592**(3): p. 265-280.
150. Khalilzadeh, O., et al., *Graves' ophthalmopathy and gene polymorphisms in interleukin-1alpha, interleukin-1beta, interleukin-1 receptor and interleukin-1 receptor antagonist*. Clin Experiment Ophthalmol, 2009. **37**(6): p. 614-9.
151. Rezaei, N., et al., *Proinflammatory cytokine gene single nucleotide polymorphisms in common variable immunodeficiency*. Clin Exp Immunol, 2009. **155**(1): p. 21-7.
152. Alayli, G., et al., *T helper 1 type cytokines polymorphisms: association with susceptibility to Behcet's disease*. Clin Rheumatol, 2007. **26**(8): p. 1299-305.
153. Mahdavian, S., et al., *Proinflammatory Cytokine Gene Polymorphisms among Iranian Patients with Asthma*. Journal of Clinical Immunology, 2009. **29**(1): p. 57-62.
154. Sarial, S., et al., *IL-1, IL-1R and TNFalpha gene polymorphisms in Iranian patients with multiple sclerosis*. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2008. **7**(1): p. 37-40.

155. Pociot, F., et al., *Genetic susceptibility markers in Danish patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes--evidence for polygenicity in man. Danish Study Group of Diabetes in Childhood.* *Autoimmunity*, 1994. **19**(3): p. 169-78.
156. Arkin, M.R., et al., *Binding of small molecules to an adaptive protein-protein interface.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(4): p. 1603-8.
157. Thèze, J., P.M. Alzari, and J. Bertoglio, *Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions.* *Immunology Today*, 1996. **17**(10): p. 481-486.
158. Cantrell, D. and K. Smith, *The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model.* *Science*, 1984. **224**(4655): p. 1312-1316.
159. Stern, J. and K. Smith, *Interleukin-2 induction of T-cell G1 progression and c-myc expression.* *Science*, 1986. **233**(4760): p. 203-206.
160. Smith, K., *Interleukin-2: inception, impact, and implications.* *Science*, 1988. **240**(4856): p. 1169-1176.
161. Waldmann, T.A., *The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design.* *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(8): p. 595-601.
162. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.* *J Immunol*, 1995. **155**(3): p. 1151-1164.
163. Daha, N.A., et al., *Confirmation of <I>STAT4</I>, <I>IL2/IL21</I>, and <I>CTLA4</I> polymorphisms in rheumatoid arthritis.* *Arthritis & Rheumatism*, 2009. **60**(5): p. 1255-1260.
164. Marquez, A., et al., *Novel Association of the Interleukin 2-Interleukin 21 Region With Inflammatory Bowel Disease.* *Am J Gastroenterol*, 2009.
165. Williams, T., et al., *Two regions within the human IL-2 gene promoter are important for inducible IL-2 expression.* *J Immunol*, 1988. **141**(2): p. 662-666.
166. Christensen, U., et al., *Family based association analysis of the IL2 and IL15 genes in allergic disorders.* *Eur J Hum Genet*, 2006. **14**(2): p. 227-35.
167. Hizawa, N., et al., *Genetic influences of chromosomes 5q31-q33 and 11q13 on specific IgE responsiveness to common inhaled allergens among African American families. Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA).* *J Allergy Clin Immunol*, 1998. **102**(3): p. 449-53.
168. Klein, S.C., et al., *An alternatively spliced Interleukin 4 form in lymphoid cells.* *Immunogenetics*, 1995. **41**(1): p. 57-57.
169. Walter, M.R., et al., *Crystal structure of recombinant human interleukin-4.* *J Biol Chem*, 1992. **267**(28): p. 20371-6.

170. Robinson, D.S., et al., *Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma*. N Engl J Med, 1992. **326**(5): p. 298-304.
171. Ying, S., et al., *Phenotype of cells expressing mRNA for TH2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and TH1-type (interleukin 2 and interferon gamma) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatic and normal control subjects*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **12**(5): p. 477-87.
172. Hadjur, S., et al., *IL4 blockade of inducible regulatory T cell differentiation: The role of Th2 cells, Gata3 and PU.1*. Immunology Letters, 2009. **122**(1): p. 37-43.
173. Pene, J., et al., *IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(18): p. 6880-4.
174. Isidoro-Garcia, M., et al., *[IL4RA gene polymorphism (Q576R) is associated with higher total IgE levels in Spanish patients with family history of atopy]*. Med Clin (Barc), 2005. **124**(6): p. 211-2.
175. Isidoro-Garcia, M., et al., *Interleukin-4 (IL4) and Interleukin-4 receptor (IL4RA) polymorphisms in asthma: a case control study*. Clin Mol Allergy, 2005. **3**: p. 15.
176. Michael, K., et al., *A complete screening of the IL4 gene: Novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2003. **112**(5): p. 893-898.
177. Trajkov, D., et al., *Association of cytokine gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease in Macedonians*. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2009. **8**(1): p. 31-42.
178. Nelms, K., et al., *The IL-4 receptor: Signaling mechanisms and biologic functions*. Annual Review of Immunology, 1999. **17**: p. 701-738.
179. Zurawski, G. and J.E. de Vries, *Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells*. Immunol Today, 1994. **15**(1): p. 19-26.
180. Beghé, B., et al., *Polymorphisms in the interleukin-4 and interleukin-4 receptor  $\alpha$ 1 chain genes confer susceptibility to asthma and atopy in a Caucasian population*. Clinical & Experimental Allergy, 2003. **33**(8): p. 1111-1117.
181. Hong, J., B.H. Miera, and R. Paul, *IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2000. **105**(6): p. 1063-1070.
182. Deichmann, K., et al., *Common Polymorphisms in the Coding Part of the IL4-Receptor Gene*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997. **231**(3): p. 696-697.
183. Hershey, G.K.K., et al., *The Association of Atopy with a Gain-of-Function Mutation in the  $\alpha$  Subunit of the Interleukin-4 Receptor*. N Engl J Med, 1997. **337**(24): p. 1720-1725.

184. Taga, T., et al., *Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130*. Cell, 1989. **58**(3): p. 573-581.
185. Yasukawa, K., et al., *Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene*. EMBO J, 1987. **6**(10): p. 2939-45.
186. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem. J., 2003. **374**(1): p. 1-20.
187. Van Snick, J., *Interleukin-6: An Overview*. Annual Review of Immunology, 1990. **8**(1): p. 253-278.
188. Somers, W., M. Stahl, and J.S. Seehra, *1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling*. EMBO J, 1997. **16**(5): p. 989-997.
189. Akira, S., T. Taga, and T. Kishimoto, *Interleukin-6 in biology and medicine*. Adv Immunol, 1993. **54**: p. 1-78.
190. Fishman, D., et al., *The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis*. The Journal of Clinical Investigation, 1998. **102**(7): p. 1369-1376.
191. Foster, C.B., et al., *An IL6 promoter polymorphism is associated with a lifetime risk of development of Kaposi sarcoma in men infected with human immunodeficiency virus*. Blood, 2000. **96**(7): p. 2562-2567.
192. Villuendas, G., et al., *The -597 G->A and -174 G->C Polymorphisms in the Promoter of the IL-6 Gene Are Associated with Hyperandrogenism*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(3): p. 1134-1141.
193. Kristiansen, O.P., et al., *Association of a functional 17{beta}-estradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early-onset type 1 diabetes in females*. Hum. Mol. Genet., 2003. **12**(10): p. 1101-1110.
194. Eskdale, J., et al., *Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence*. Immunogenetics, 1997. **46**(2): p. 120-128.
195. Zdanov, A., et al., *Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma*. Structure, 1995. **3**(6): p. 591-601.
196. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression*. J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 915-24.
197. Larry, B., et al., *Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma*. The Journal of allergy and clinical immunology, 1996. **97**(6): p. 1288-1296.

198. Westendorp, R.G., et al., *Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease*. Lancet, 1997. **349**(9069): p. 1912-3.
199. Turner, D.M., et al., *An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter*. Eur J Immunogenet, 1997. **24**(1): p. 1-8.
200. Rosenwasser, L.J. and L. Borish, *Genetics of Atopy and Asthma: The Rationale behind Promoter-based Candidate Gene Studies (IL-4 and IL-10)*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1997. **156**(4): p. S152-155.
201. Yoon, S.I., et al., *Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex*. J Biol Chem, 2006. **281**(46): p. 35088-96.
202. Eskdale, J., et al., *Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(16): p. 9465-9470.
203. Movahedi, M., et al., *IL-10, TGF-B1, IL-2, IL-12, and IFN-G Cytokine Gene Polymorphisms in Asthma*. Journal of Asthma, 2008. **45**(9): p. 790 - 794.
204. Karjalainen, J., et al., *Interleukin-10 gene promoter region polymorphism is associated with eosinophil count and circulating Immunoglobulin E in adult asthma*. Clinical & Experimental Allergy, 2003. **33**(1): p. 78-83.
205. Trinchieri, G., *Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes*. Blood, 1994. **84**(12): p. 4008-4027.
206. Huang, D., M.R. Cancilla, and G. Morahan, *Complete primary structure, chromosomal localisation, and definition of polymorphisms of the gene encoding the human interleukin-12 p40 subunit*. Genes Immun, 2000. **1**(8): p. 515-20.
207. Yoon, C., et al., *Charged residues dominate a unique interlocking topography in the heterodimeric cytokine interleukin-12*. EMBO J, 2000. **19**(14): p. 3530-3541.
208. Marsha, W.-K., *IL-12/IL-13 axis in allergic asthma*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2001. **107**(1): p. 9-18.
209. Yokouchi, Y., et al., *Significant Evidence for Linkage of Mite-Sensitive Childhood Asthma to Chromosome 5q31-q33 near the Interleukin 12 B Locus by a Genome-wide Search in Japanese Families*. Genomics, 2000. **66**(2): p. 152-160.
210. Tomomitsu, H., et al., *Functional haplotypes of IL-12B are associated with childhood atopic asthma*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2005. **116**(4): p. 789-795.
211. Schoenborn, J.R., C.B. Wilson, and W.A. Frederick, *Regulation of Interferon[hyphen (true graphic)][gamma] During Innate and Adaptive Immune Responses*, in *Advances in Immunology*. 2007, Academic Press. p. 41-101.

212. Gray, P.W. and D.V. Goeddel, *Structure of the human immune interferon gene*. Nature, 1982. **298**(5877): p. 859-63.
213. Schroder, K., et al., *Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-189.
214. Pravica, V., et al., *In vitro production of IFN- $\gamma$ ; correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN- $\gamma$  gene*. European Journal of Immunogenetics, 1999. **26**(1): p. 1-3.
215. Dufour, C., et al., *Homozygosis for (12) CA repeats in the first intron of the human IFN- $\gamma$  gene is significantly associated with the risk of aplastic anaemia in Caucasian population*. British Journal of Haematology, 2004. **126**(5): p. 682-685.
216. Pravica, V., et al., *A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- $\gamma$  gene: Absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- $\gamma$  production*. Human Immunology, 2000. **61**(9): p. 863-866.
217. Hussein, Y.M., et al., *Interferon gamma gene polymorphism as a biochemical marker in Egyptian atopic patients*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2009. **19**(4): p. 292-8.
218. Sporn, M. and A. Roberts, *Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges*. J. Cell Biol., 1992. **119**(5): p. 1017-1021.
219. Derynck, R., et al., *Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells*. Nature, 1985. **316**(6030): p. 701-5.
220. Letterio, J.J. and A.B. Roberts, *Regulation of immune responses by TGF-beta*. Annual Review of Immunology, 1998. **16**: p. 137-161.
221. Chen, W., et al., *TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu*. Immunity, 2001. **14**(6): p. 715-25.
222. Sonoda, E., et al., *Pillars Article: Transforming Growth Factor  $\beta$  Induces IgA Production and Acts Additively with Interleukin 5 for IgA Production*. J. Exp. Med. 1989. **170**: 1415-1420. J Immunol, 2009. **182**(1): p. 14-19.
223. Kay, A.B., S. Phipps, and D.S. Robinson, *A role for eosinophils in airway remodelling in asthma*. Trends in Immunology, 2004. **25**(9): p. 477-482.
224. Redington, A.E., et al., *Transforming Growth Factor-beta 1 in Asthma . Measurement in Bronchoalveolar Lavage Fluid*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1997. **156**(2): p. 642-647.
225. Lv, J., et al., *Association of Five Single Nucleotide Polymorphism loci with Asthma in Children of Chinese Han Nationality*. Journal of Asthma, 2009. **46**(6): p. 582 - 585.
226. Silverman, E.S., et al., *Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Promoter Polymorphism C-509T Is Associated with Asthma*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2004. **169**(2): p. 214-219.

227. Kim, S.-H., et al., *Combined effect of IL-10 and TGFB1 promoter polymorphisms as a risk factor for aspirin-intolerant asthma and rhinosinusitis*. *Allergy*, 2009. **64**(8): p. 1221-1225.
228. Acevedo, N., et al., *The C-509T Promoter Polymorphism of the Transforming Growth Factor Beta-1 Gene Is Associated with Levels of Total and Specific IgE in a Colombian Population*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2009. **151**(3): p. 237-246.
229. Sharma, S., et al., *Variants in TGFB1, Dust Mite Exposure, and Disease Severity in Children with Asthma*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2009. **179**(5): p. 356-362.
230. Mann, S.K. and J.A. Hadwiger, *Up the down staircase. Signal Transduction and Gene Activation in Development: a UCLA Symposium sponsored by Amgen, Steamboat Springs, CO, USA, March 31-April 7, 1990*. *New Biol*, 1990. **2**(7): p. 601-4.
231. Awad, M.R., et al., *GENOTYPIC VARIATION IN THE TRANSFORMING GROWTH FACTOR-[beta]1 GENE: Association with Transforming Growth Factor-[beta]1 Production, Fibrotic Lung Disease, and Graft Fibrosis after Lung Transplantation*. *Transplantation*, 1998. **66**(8): p. 1014-1020.
232. Judith, C.W.M., et al., *Analysis of TGF- $\beta$ 1 gene polymorphisms in Hong Kong Chinese patients with asthma*. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2006. **117**(1): p. 92-96.
233. Vassalli, P., *The pathophysiology of tumor necrosis factors*. *Annu Rev Immunol*, 1992. **10**: p. 411-52.
234. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
235. Bonifati, C. and F. Ameglio, *Cytokines in psoriasis*. *Int J Dermatol*, 1999. **38**(4): p. 241-51.
236. Gorman, J.D., K.E. Sack, and J.C. Davis, Jr., *Treatment of ankylosing spondylitis by inhibition of tumor necrosis factor alpha*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(18): p. 1349-56.
237. Nadkarni, S., C. Mauri, and M.R. Ehrenstein, *Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta*. *J Exp Med*, 2007. **204**(1): p. 33-9.
238. Rasmussen, S.K., et al., *The -238 and -308 G-->A polymorphisms of the tumor necrosis factor alpha gene promoter are not associated with features of the insulin resistance syndrome or altered birth weight in Danish Caucasians*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(4): p. 1731-4.
239. Mira, J.P., et al., *Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study*. *JAMA*, 1999. **282**(6): p. 561-8.
240. McGuire, W., et al., *Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria*. *Nature*, 1994. **371**(6497): p. 508-10.



241. Old, L.J., *Tumor necrosis factor (TNF)*. Science, 1985. **230**(4726): p. 630-2.
242. Nedwin, G.E., et al., *Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization*. Nucleic Acids Res, 1985. **13**(17): p. 6361-73.
243. Hajeer, A.H. and I.V. Hutchinson, *Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease*. Hum Immunol, 2001. **62**(11): p. 1191-9.
244. Tang, P., M.C. Hung, and J. Klostergaard, *Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer*. Biochemistry, 1996. **35**(25): p. 8216-25.
245. Black, R.A., et al., *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells*. Nature, 1997. **385**(6618): p. 729-33.
246. Eck, M.J. and S.R. Sprang, *The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding*. J Biol Chem, 1989. **264**(29): p. 17595-605.
247. Tartaglia, L.A., et al., *The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(20): p. 9292-6.
248. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, *Tumor necrosis factor signaling*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 45-65.
249. Chen, G. and D.V. Goeddel, *TNF-R1 signaling: a beautiful pathway*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1634-5.
250. Gaur, U. and B.B. Aggarwal, *Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily*. Biochemical Pharmacology, 2003. **66**(8): p. 1403-1408.
251. Wilson, A.G., et al., *Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 3195-9.
252. Shiau, M.Y., et al., *TNF-alpha polymorphisms and type 2 diabetes mellitus in Taiwanese patients*. Tissue Antigens, 2003. **61**(5): p. 393-7.
253. Winchester, E.C., et al., *Association of the TNF-alpha-308 (G-->A) polymorphism with self-reported history of childhood asthma*. Hum Genet, 2000. **107**(6): p. 591-6.
254. Zedan, M., et al., *Gene polymorphisms of tumor necrosis factor alpha-308 and interleukin-10-1082 among asthmatic Egyptian children*. Allergy Asthma Proc, 2008. **29**(3): p. 268-73.
255. Kamali-Sarvestani, E., M.A. Ghayomi, and A. Nekoei, *Association of TNF-alpha -308 G/A and IL-4 -589 C/T gene promoter polymorphisms with asthma susceptibility in the south of Iran*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2007. **17**(6): p. 361-6.
256. Hong, S.J., et al., *TNF-alpha (-308 G/A) and CD14 (-159T/C) polymorphisms in the bronchial responsiveness of Korean children with asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(2): p. 398-404.

257. Buranawuti, K., et al., *Variants in mannose-binding lectin and tumour necrosis factor alpha affect survival in cystic fibrosis*. J Med Genet, 2007. **44**(3): p. 209-14.
258. Koss, K., et al., *Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies*. Genes Immun, 2000. **1**(3): p. 185-90.
259. *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): p. S77-121.
260. Crapo, R.O., 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): p. 309-29.
261. *Skin tests used in type I allergy testing Position paper. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology*. Allergy, 1989. **44 Suppl 10**: p. 1-59.
262. Newton, C.R., et al., *Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)*. Nucl. Acids Res., 1989. **17**(7): p. 2503-2516.
263. *PCR Application Manual*. 2nd ed, ed. R.M. Diagnostics. 1999.
264. Patton S, S.S., *Draft Best Practice Guidelines for Laboratory Internal Quality Control*. European Molecular Genetics Quality Network, 2002.
265. Wacholder, S., et al., *Assessing the Probability That a Positive Report is False: An Approach for Molecular Epidemiology Studies*. J. Natl. Cancer Inst., 2004. **96**(6): p. 434-442.
266. Shi, Y.Y. and L. He, *SHESis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci*. Cell Res, 2005. **15**(2): p. 97-98.
267. Li, Z., et al., *A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers: update of the SHESis (<http://analysis.bio-x.cn>)*. Cell Res. **19**(4): p. 519-523.
268. Yoo, J., B. Seo, and Y. Kim, *SNPAnalyzer: a web-based integrated workbench for single-nucleotide polymorphism analysis*. Nucl. Acids Res., 2005. **33**(suppl\_2): p. W483-488.
269. Moore, J.H., et al., *A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility*. Journal of Theoretical Biology, 2006. **241**(2): p. 252-261.
270. Mao, X.-Q., et al., *Imbalance Production between Interleukin-1B (IL-1B) and IL-1 Receptor Antagonist (IL-1Ra) in Bronchial Asthma*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **276**(2): p. 607-612.

271. Hoffmann, S.C., et al., *Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes*. Transplantation, 2001. **72**(8): p. 1444-50.
272. Chatterjee, R., J. Batra, and B. Ghosh, *A common exonic variant of interleukin21 confers susceptibility to atopic asthma*. Int Arch Allergy Immunol, 2009. **148**(2): p. 137-46.
273. Amirzargar, A.A., et al., *Polymorphisms in IL4 and iLARA confer susceptibility to asthma*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2009. **19**(6): p. 433-8.
274. Papassotiropoulos, A., et al., *A genetic variation of the inflammatory cytokine interleukin-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 1999. **45**(5): p. 666-8.
275. Phillips, C.M., et al., *Additive effect of polymorphisms in the IL-6, LTA, and TNF- $\alpha$  genes and plasma fatty acid level modulate risk for the metabolic syndrome and its components*. J Clin Endocrinol Metab. **95**(3): p. 1386-94.
276. Kim, S.H., et al., *Combined effect of IL-10 and TGF-beta1 promoter polymorphisms as a risk factor for aspirin-intolerant asthma and rhinosinusitis*. Allergy, 2009. **64**(8): p. 1221-5.
277. Randolph, A.G., et al., *The IL12B gene is associated with asthma*. Am J Hum Genet, 2004. **75**(4): p. 709-15.
278. Muller-Berghaus, J., et al., *Deficient IL-12p70 secretion by dendritic cells based on IL12B promoter genotype*. Genes Immun, 2004. **5**(5): p. 431-434.
279. Siew-Kim, K., et al., *Associations of the IL12B promoter polymorphism in longitudinal data from asthmatic patients 7 to 42 years of age*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2004. **113**(3): p. 475-481.
280. Shah, A., M.K. Church, and S.T. Holgate, *Tumour necrosis factor alpha: a potential mediator of asthma*. Clin Exp Allergy, 1995. **25**(11): p. 1038-44.
281. Castro-Giner, F., et al., *TNFA -308G>A in two international population-based cohorts and risk of asthma*. Eur Respir J, 2008. **32**(2): p. 350-361.
282. Randolph, A.G., et al., *Extended haplotype in the tumor necrosis factor gene cluster is associated with asthma and asthma-related phenotypes*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(6): p. 687-92.
283. Wang, T.N., et al., *Gene-gene synergistic effect on atopic asthma: tumour necrosis factor-alpha-308 and lymphotoxin-alpha-Ncol in Taiwan's children*. Clin Exp Allergy, 2004. **34**(2): p. 184-8.
284. Louis, R., et al., *Lack of association between adult asthma and the tumour necrosis factor alpha-308 polymorphism gene*. Eur Respir J, 2000. **16**(4): p. 604-8.

285. Shin, H.D., et al., *Association of tumor necrosis factor polymorphisms with asthma and serum total IgE*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(4): p. 397-403.
286. Kroeger, K.M., K.S. Carville, and L.J. Abraham, *The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription*. Mol Immunol, 1997. **34**(5): p. 391-9.
287. Jiménez-Morales, S., et al., *Tumor necrosis factor-[alpha] is a common genetic risk factor for asthma, juvenile rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus in a Mexican pediatric population*. Human Immunology, 2009. **70**(4): p. 251-256.
288. Howarth, P.H., et al., *Tumour necrosis factor (TNFalpha) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma*. Thorax, 2005. **60**(12): p. 1012-8.
289. Berry, M.A., et al., *Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma*. N Engl J Med, 2006. **354**(7): p. 697-708.
290. John, J.M.M., et al., *Analysis of the high affinity IgE receptor genes reveals epistatic effects of *FCER1A* variants on eczema risk*. Allergy, 2009. **9999**(9999).
291. Kim, S.-H., et al., *Association of Four-locus Gene Interaction with Aspirin-intolerant Asthma in Korean Asthmatics*. Journal of Clinical Immunology, 2008. **28**(4): p. 336-342.
292. Bottema, R.W., et al., *Gene-gene interaction in regulatory T-cell function in atopy and asthma development in childhood*. J Allergy Clin Immunol.
293. Iris, H.S.C., et al., *Gene-gene interactions for asthma and plasma total IgE concentration in Chinese children*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2006. **117**(1): p. 127-133.

