

00524  
137



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"POLIMORFISMO -308 Y -238 DEL FACTOR DE NECROSIS  
TUMORAL EN PACIENTES CON FIBROSIS PULMONAR  
IDIOPATICA"

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
P R E S E N T A :  
**GLORIA PEREZ RUBIO**



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D. F.

2003



A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

https://doi.org/10.1016/j.procs.2017.05.011

# PAGINACION

# DISCONTINUA

Jurado asignado:

Presidente

QFB. Magdalena Acosta Segura.

Vocal

Dra. Ana Esther Aguilar Cárdenas.

Secretario

QFB. Ángel E. Camarena Olvera.

1er Suplente

M en C. Luz del Carmen Castellanos Román.

2do Suplente

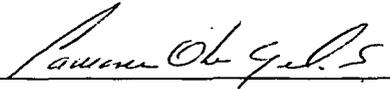
Dra. Ma. Elena Ibarra Rubio.

Sitio donde se desarrolló el tema:

**Laboratorio de Inmunología.  
Departamento de Asma, Alergia e Inmunología Clínica.  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.**

ASESOR:

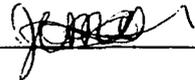
QFB Ángel E. Camarena Olvera



---

SUPERVISORA TÉCNICA:

Biol. Ma. Armida Juárez Cisneros



---

SUSTENTANTE:

Gloria Pérez Rubio



---

## AGRADECIMIENTOS

Porque mi único apoyo ha sido la fe, porque permitiste que la fe naciera de mi interior para jamás perderla, por darme el valor en los momentos más difíciles y la capacidad de disfrutar mi vida al máximo, gracias **Dios**.

A Gloria Rubio Gutiérrez, por darme la vida y todo lo que ahora tengo, por enseñarme a valorar lo que me rodea, porque eres una mujer ejemplar en mi vida, y porque simplemente yo sin ti no sería nadie, te quiero y te doy gracias **mamá**.

A Victoriano Pérez Muñoz por confiar en mí en todos los aspectos por quererme mucho, y estar a mi lado quiero que sepas que te quiero y que agradezco tu apoyo, gracias **papá**.

Porque los tres juntos hemos vivido alegrías y tristezas, por hacerme sentir especial y darme todo su cariño y apoyo, gracias: a mi hermano **Victor**, por ser como es y a mi hermana **Susana** por estar a mi lado.

A mi familia que aún tengo a mi lado, principalmente a **María** y a aquella que por azares de la vida ya no está a mi lado, gracias por su cariño y por formar parte de mí.

A **Rancés** por ser para mí: maestro, amigo, confidente, asesor, psicólogo, refugio, etcétera, gracias por estar a mi lado de forma incondicional.

A mis amigas **Claudia, Miryan y Jessica** por haber estado a mi lado en las buenas y en las malas, por haberme dado ejemplos de vida, gracias por su apoyo sincero, siempre seguiremos juntas

Agradezco al químico Ángel Camarena por su apoyo para realizar este trabajo, por sus consejos y su gran paciencia los cuales estoy segura me servirán en mi vida profesional y sobre todo personal.

A la bióloga Armida para que pudiera llevar a cabo la realización de éste trabajo.  
Gracias por su apoyo.

A mis compañeros del laboratorio: Ramcés, María Cecilia, Arnoldo, Doroteo y Audelia, por ayudarme en todo lo posible, por su gran paciencia y cariño, gracias por estar ahí haciendo de mi estancia en el laboratorio algo genial.

A los miembros de mi jurado por ayudarme en la realización de este trabajo, así como en mi formación profesional. Gracias

A todos mis profesores y compañeros que estuvieron a mi lado, a las personas que me rodearon, gracias por la experiencia.

Al II, al Conamat, al CCIA y al INP, así como a las personas que los forman, gracias por ser parte de mi vida, por confiar en mi y por permitirme adquirir experiencias profesionales y sobre todo de vida.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por haberse convertido en mi segundo hogar junto con la **Facultad de Química**, gracias por contribuir en mi superación personal.

Al **INER** por haber permitido realizar mi tesis.

D

**"Aunque fugaz, siempre has sido voraz, has llegado a ser combustible en mi vida, capaz de demostrarme que lo imposible no existe, por ti he logrado burlarme del planeta y de sus prejuicios, a sentirme única."  
Gloria P. R.**

**"Si ésta gota de agua no existiese, el océano la echaría de menos."  
Madre Teresa**

**"Es más fácil desintegrar un átomo que un prejuicio."  
Albert Einstein**

**"El conocimiento es único.  
su división en materias es una concesión  
a la debilidad humana."  
Sir John Harford McKinder**

**"A los fracasos no hay que darles tiempo,  
es lo peor que puede hacerse porque enseguida  
lo impregnan y contaminan todo"  
Javier Marías**

**"La imaginación nos vuelve inconformes,  
la memoria nos vuelve nostálgicos,  
la experiencia nos deja frustrados  
y la razón, cuando usamos a fondo la razón,  
nos revela ridículos"  
Óscar de la Borbolla**

## ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas	i
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	v
<b>I. Resumen</b>	<b>1</b>
<b>II. Introducción</b>	<b>2</b>
<b>III. Factor de necrosis tumoral</b>	<b>3</b>
3.1 Antecedentes históricos	3
3.2 Estructura e inducción	5
3.3 Actividad biológica	7
3.4 Receptores	8
3.5 Transducción de señales	10
3.6 Polimorfismo	12
3.7 Regulación de la expresión génica	14
3.8 Relación con enfermedades	15
<b>IV. Fibrosis pulmonar idiopática</b>	<b>17</b>
4.1 Antecedentes	17
4.2 Definición de la patología	18
4.3 Epidemiología	19
4.4 Inmunopatogénesis	20
<b>V. Hipótesis, justificación y objetivos</b>	<b>23</b>
<b>VI. Metodología</b>	<b>25</b>
6.1 Diseño experimental	25

6.2 Extracción de ADN	26
6.3 Amplificación de ADN por PCR-RFLP	26
6.4 Visualización del producto amplificado	29
6.5 Digestión enzimática y visualización de productos	30
6.6 Análisis estadístico	31
<b>VII. Resultados</b>	<b>34</b>
<b>VIII. Discusión</b>	<b>39</b>
<b>IX. Conclusiones</b>	<b>41</b>
<b>X. Apéndice</b>	<b>42</b>
10.1 Material y equipo	42
10.2 Reactivos	43
10.3 Preparación de reactivos	43
10.4 Método de extracción de ADN	46
10.5 Cuantificación de ADN	47
<b>XI. Bibliografía</b>	<b>48</b>

## ABREVIATURAS

1C7	Gen que codifica una secuencia señal de ciertas proteínas ancladas en la membrana celular
aa	Aminoácidos
ADAM	Adamolisina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AP-1	Proteína activadora tipo 1
AP-2	Proteína activadora tipo 2
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
B144	Gen de transcripción específico de leucocitos, también llamado LST-1,
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
Bf	Factor B de la vía alternativa del complemento
C2	Proteína sérica de la vía clásica del complemento
C4a y C5a	Anafilotoxinas generadas por la cascada del complemento
C4b	Forma metaestable de C4 de la vía del complemento
CAP	Proteína fosfatasa citosólica del tipo A2 dependiente de ceramida
CAPK	Proteína cinasa dependiente de ceramida
CD4	Marcador de células T restringidas por el MHC clase II
CD8	Marcador de células T restringidas por el MHC clase I
Células NK	Células asesinas naturales
c-fos, c-myc y c-jun	Proto-oncogenes humanos relacionados con el control de la proliferación celular
D	Dalton
DD	Dominio de muerte
dNTP's	Deoxinucleótidos trifosfatos
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FA	Frecuencia antigénica
FADD	Proteína asociada al dominio de muerte del factor apoptótico soluble
FAN	Factor asociado con la activación de esfingomielinasa neutra

Fas	Factor apoptótico soluble
Fc	Fragmento cristalino
FG	Frecuencia génica
FLICE	Proteína homóloga de FADD
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos
HLA	Antígeno leucocitario humano
Hsp70	Proteína de choque térmico 70
IC	Intervalo de confianza
I $\kappa$ B	Molécula que regula de forma negativa al factor nuclear $\kappa$ B
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL-1, 2, 4, 6, 8	Interleucina 1, 2, 4, 6 y 8
JUNK	Proteína cinasa que regula postraduccionalmente a c-jun
kb	Kilobases
Kd	Constante de disociación
KD	Kilodalton
Linfocito Th1	Linfocito T cooperador tipo 1
Linfocito Th2	Linfocito T cooperador tipo 2
LPS	Lipopolisacárido
LT $\alpha$	Linfotoxina alfa
LT $\beta$	Linfotoxina beta
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MICA y MICB	Familia de genes y pseudogenes homólogos a la clase I del MHC
n	Individuos totales que forman la población en estudio
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa B
NID	Neumopatías intersticiales difusas
NO	Nitrosilo
NOS	Óxido nítrico sintetasa
NSD	Esfingomielinasa neutra
OD	Densidad óptica
OR	Razón de momios
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

<b>PDGF</b>	<b>Factor de crecimiento derivado de plaquetas</b>
<b>RFLP</b>	<b>Polimorfismos de fragmentos de restricción</b>
<b>RIP</b>	<b>Proteína de interacción con el receptor de TNF</b>
<b>rpm</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>RR</b>	<b>Riesgo relativo</b>
<b>SDS</b>	<b>Dodecil sulfato de sodio o laurilsulfato de sodio</b>
<b>SK12W</b>	<b>Proteína semejante a la proteína de la levadura Ski2</b>
<b>SSC</b>	<b>Solución salina de citratos</b>
<b>TACE</b>	<b>Enzima convertasa de TNF</b>
<b>TBE</b>	<b>Amortiguador de tris-base, ácido bórico y EDTA</b>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<b>Factor transformante de crecimiento beta</b>
<b>TNF</b>	<b>Factor de necrosis tumoral</b>
<b>TNF1</b>	<b>Alelo silvestre del polimorfismo -308 del TNF</b>
<b>TNF2</b>	<b>Variante alélica del polimorfismo -308 del TNF</b>
<b>TNFA</b>	<b>Variante alélica del polimorfismo -238 del TNF</b>
<b>TNFG</b>	<b>Alelo silvestre del polimorfismo -238 del TNF</b>
<b>TNFR1</b>	<b>Receptor tipo 1 del TNF de 55 kD</b>
<b>TNFR2</b>	<b>Receptor tipo 2 del TNF de 75 kD</b>
<b>TRADD</b>	<b>Proteína asociada al dominio de muerte del receptor 1 del TNF</b>
<b>TRAFs</b>	<b>Factor asociado al receptor del TNF</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modelo de listón que representa la forma activa del TNF humano.	6
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de la transducción de señales desencadenadas por la unión del factor de necrosis tumoral a sus receptores.	11
<b>Figura 3.</b> Localización en el cromosoma 6 humano del factor de necrosis tumoral mostrando los polimorfismos más importantes.	13
<b>Figura 4.</b> Células que probablemente contribuyen al daño pulmonar y su progresión a fibrosis.	21
<b>Figura 5.</b> Detección del polimorfismo TNF -308 por PCR-RFLP.	34

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Distribución alélica del polimorfismo –308 del TNF en diferentes poblaciones estudiadas.	14
<b>Tabla 2.</b> Secuencias de los iniciadores empleados para el polimorfismo TNF –308.	28
<b>Tabla 3.</b> Secuencias de los iniciadores empleados para el polimorfismo TNF –238.	28
<b>Tabla 4.</b> Mezcla reactiva para llevar a cabo la PCR de cada polimorfismo a estudiar.	28
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de ciclaje para el polimorfismo TNF –308.	29
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de ciclaje para el polimorfismo TNF –238.	29
<b>Tabla 7.</b> Enzimas de restricción empleadas para identificar los polimorfismos de TNF.	30
<b>Tabla 8.</b> Mezcla de reactivos empleados para poder llevar a cabo la digestión de los amplificadores.	31
<b>Tabla 9.</b> Tamaño de los productos esperados para el polimorfismo TNF –308.	31
<b>Tabla 10.</b> Tamaño de los productos esperados para el polimorfismo TNF –238.	31
<b>Tabla 11.</b> Tabla de contingencia de 2 x 2 para la prueba de $\chi^2$ .	32

<b>Tabla 12.</b> Frecuencia antigénica (FA) y génica (FG) de los alelos de TNF –308 en pacientes con FPI y el grupo control.	37
<b>Tabla 13.</b> Genotipos del polimorfismo de TNF –308 en pacientes con FPI en comparación con el grupo control.	37
<b>Tabla 14.</b> Frecuencia antigénica (FA) y génica (FG) de los alelos de TNF –238 en pacientes con FPI y el grupo control.	38
<b>Tabla 15.</b> Genotipos del polimorfismo de TNF –238 en pacientes con FPI en comparación con el grupo control.	38

## I. RESUMEN

La fibrosis pulmonar idiopática, es una enfermedad crónica del parénquima pulmonar caracterizada por ser progresiva, incapacitante y letal, de etiología desconocida afecta primordialmente a los alvéolos y su intersticio, posiblemente se trata de la respuesta a uno o más agresores que pueden provenir del ambiente y que junto con agentes internos, entre ellos componentes genéticos, activan la cascada de eventos que conllevan al desarrollo de la fibrosis.

En el presente estudio se evaluó la participación del factor de necrosis tumoral, dicha proteína es una citocina proinflamatoria que dependiendo de su concentración plasmática tiene diferente actividad biológica; a concentraciones bajas presenta efectos locales, mejorando así los mecanismos de defensa del huésped, a concentraciones altas puede causar lesión en algunos tejidos. En el promotor del gen de dicha citocina se han identificado polimorfismos puntuales, los ubicados en las posiciones -308 y -238 son de gran interés pues se ha descrito que, la capacidad transcripcional del gen aumenta si está presente la variante alélica de cada polimorfismo, lo anterior hace suponer que tal proceso está determinado genéticamente. En éste caso, para identificar la variante alélica de los polimorfismos fue usada la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en su modalidad: polimorfismos de fragmentos de restricción de (PCR-RFLP), se tipificaron a 50 pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y 55 individuos clínicamente sanos. Los resultados mostraron que, la presencia del genotipo TNF -308 1/2 y el TNF -238 G/A del promotor del gen del factor de necrosis tumoral, probablemente tienen un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad; el análisis molecular de los alélos de la proteína en estudio revelaron que, el TNF2 del polimorfismo -308 y el TNFA del polimorfismo -238, predisponen al individuo a presentar una forma más severa de inflamación en la fibrosis pulmonar idiopática.

En este caso, se trató de contribuir al conocimiento de la patología, mediante la identificación de grupos poblacionales de alto riesgo, por medio de posibles marcadores genéticos los cuales pueden funcionar como activadores en la fibrosis pulmonar idiopática.

## II. INTRODUCCIÓN

Las neumopatías intersticiales difusas (NID), son un grupo de padecimientos respiratorios subagudos y crónicos, caracterizados por comprometer difusamente al parénquima pulmonar se clasifican como de etiología conocida y desconocida. La NID más importante de etiología desconocida es la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), en términos de que es habitualmente progresiva, incapacitante y letal en un período breve de tiempo. Se caracteriza por tres rasgos principales: instalación de células inflamatorias en el tracto respiratorio inferior, daño del epitelio alveolar y liberación de citocinas por parte de las células inflamatorias que estimulan la proliferación de fibroblastos, así como la síntesis y deposición de constituyentes de la matriz extracelular, principalmente colágena. <sup>(57, 98)</sup>

Se han reportado casos en familias donde más de un miembro padece fibrosis pulmonar idiopática. Por tal motivo, aumenta la probabilidad de que exista predisposición genética a padecerla, se incluyen polimorfismos en los genes para algunas citocinas proinflamatorias, entre ellas el factor de necrosis tumoral TNF (del inglés *tumor necrosis factor*), estudios previos indican que la citocina tiene actividad pleiotrópica según su concentración plasmática, hay datos de polimorfismos ubicados en la región promotora de la proteína en estudio los cuales intervienen en la regulación de la transcripción génica encontrando que, los más importantes son los ubicados en las posiciones -238 y -308. <sup>(5)</sup>

El TNF se encuentra dentro del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés *major histocompatibility complex*), localizado en el cromosoma 6 (6p21.31), éste último, en el humano recibe el nombre de HLA (del inglés *human leucocitary antigens*), convencionalmente esta dividido en cuatro regiones contiguas que contiene 264 loci identificados (genes y pseudogenes); la región más centromérica es la clase II la cual determina glucoproteínas de membrana en células presentadoras de antígeno; próxima a dicha región se encuentra la clase III, codifica para algunos componentes del sistema del complemento (C4a, C4b, C2 y Bf), le sigue la región de clase IV que tiene un gran número de genes involucrados en la inflamación, el estrés y en procesos inflamatorios (TNF, LT  $\alpha$ , LT  $\beta$ , B144, 1C7, AIF-1, Hsp70, Sk12w, IkBL, BAT1, MICA, MICB) y por último, hacia el telómero, está la región de clase I, estos genes determinan glucoproteínas de membrana. <sup>(6, 41, 48)</sup>

### III. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

#### 3.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La capacidad del ser vivo de ejercer "vigilancia inmunológica", es desafiada cuando se observa la formación de tumores, sin embargo, está claro que bajo ciertas circunstancias es posible impedir la progresión de ellos, un ejemplo de esto es la necrosis hemorrágica tumoral observada en humanos y animales que cursan por una infección bacteriana, particularmente aquellas donde están involucrados organismos Gram-negativos.

Con tales antecedentes, en 1892 William B. Coley en los Estados Unidos y F. Fehleisen en Alemania, emplearon la inoculación de bacterias vivas como tratamiento contra el cáncer, sin embargo, tenían ciertos problemas ya que, en algunas ocasiones era difícil infectar a la mayoría de los pacientes y cuando ésta ocurría, no siempre se tenía la posibilidad de controlar tal infección debido a que aún no se contaba con antibióticos. <sup>(11, 80)</sup>

Posteriormente, Coley en 1893 uso bacterias muertas, mezcló *Streptococo pyogenes* y *Serratia marcescens*, a tal mezcla se le conoció como las toxinas de Coley, al inocularlas en humanos, observó que presentaban algunos síntomas similares a una infección bacteriana real. En 1934 la Asociación Médica Americana, declaró que las toxinas de Coley eran la única terapia sistémica conocida para el tratamiento del cáncer, pero como no todos los tumores de los pacientes tratados con toxinas desaparecían y con los avances en la radioterapia y la quimioterapia, el uso clínico de ellas fue quedando en desuso. <sup>(11, 80)</sup>

El interés en el valor potencial de bacterias como tratamiento para el cáncer, no finalizó con W. Coley, pues su hija Helen Coley Nauts, se dedicó a hacer otras investigaciones confirmando que cierto número de agentes infecciosos y sus productos tenían efectos contra el cáncer en animales. En particular demostró que la inyección de bacterias Gram-negativas, podía causar necrosis hemorrágica tumoral en ratones. <sup>(11, 80)</sup>

Murray J. Shear en 1943 identificó y purificó el componente activo de las bacterias Gram-negativas, lo llamó lipopolisacárido (LPS) siendo el mayor componente de la pared celular bacteriana. Tal hallazgo era limitado debido a que el LPS es demasiado tóxico en humanos, además de causar necrosis tumoral, en cantidades elevadas puede llevar a la anafilaxia y hasta a la muerte (las propiedades tóxicas del LPS motivaron para que se le conociera como endotoxina). <sup>(11, 80)</sup>

En 1950, Baruj Benacerraf y Lloyd J. Old en Nueva York, estudiaron otro agente bacteriano que posteriormente tomó un papel importante en el descubrimiento del factor de necrosis tumoral: el bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Infectaron ratones con BCG y mostraron que podía provocar en cierto grado la destrucción del cáncer, pero los hallazgos por ningún medio explicaban el mecanismo de destrucción tumoral. Estudios *in vitro* probaron que ni el BCG ni el LPS inhiben o lisan directamente a las células tumorales, ciertamente, la acción microbiana es indirecta y mediada por una respuesta en el huésped. (11, 80)

Elizabeth A. Carswell, Robert L. Kassel, Barbara D. Williamson y Lloyd J. Old en 1971, descubrieron el TNF gracias a diversos estudios, ellos trataban de modificar el nivel del factor antitumoral en sangre, probaron con suero de ratones inyectados con BCG, LPS o ambos. El suero de ratones infectados con BCG y los inyectados con LPS causó necrosis hemorrágica del sarcoma en el ratón. Posteriormente se mostró que el suero de ratones inoculados con BCG-LPS era citotóxico para células L (línea celular de fibroblastos transformada), también se probó que el suero de ratones inyectados con BCG o con endotoxina no era activo contra las células L, tampoco se encontraba acción citotóxica directa cuando se agregaba BCG o endotoxina a las células en cultivo. (11, 80)

Aunado a lo anterior, durante muchos años había existido la especulación de que los macrófagos presentan un papel importante en la actividad antitumoral de los productos microbianos, ahora se sabe que el LPS y el BCG actúan sobre los macrófagos activándolos y por consiguiente, tienen la capacidad para inhibir o destruir células tumorales *in vitro* a través de una variedad de mecanismos, entre ellos, la producción de intermediarios reactivos de oxígeno. El descubrimiento del TNF llevó a producirlo rápidamente en conejos, ratas y cobayos, el siguiente paso era aislarlo y definir sus características químicas. (11, 80)

El proceso de purificación fue difícil porque aunque el factor se detectaba en sangre de animales tratados con LPS o con BCG usualmente estaba presente en cantidades bajas. Katsuyuki Haranaka y L. J. Old demostraron que tal sustancia es una proteína. Haranaka junto con Nobuko Satomi en Tokio, obtuvieron el polipéptido de la sangre de ratones y conejos, con su posterior purificación se encontró que se trata de una proteína con un peso molecular de 40 kilodalton (kD). (11, 80)

Mientras tanto, Danielle N. Männel, Stephan E. Mergenhagen y N. Matthews demostraron que los macrófagos son fuente importante del TNF. Los esfuerzos por purificar tal citocina culminaron en 1984 cuando el gen fue clonado y se identificó la secuencia de aminoácidos gracias a la asociación de varias compañías biotecnológicas, para ello se

emplearon dos estrategias de clonación: una realizada por el grupo de japoneses donde fue purificado a partir de sueros de conejos y la otra empleada por Genentech Inc. y Biogen SA. que lo produjeron en líneas celulares HL-60. A partir de entonces se cuenta con bastante información sobre la actividad biológica del TNF. <sup>(11, 80)</sup>

### 3.2 ESTRUCTURA E INDUCCIÓN

La principal fuente celular del TNF son los fagocitos mononucleares activados, aunque también puede ser secretado por linfocitos T y B estimulados (los linfocitos CD4 Th2 producen menor cantidad de TNF que los linfocitos CD4 Th1; lo mismo ocurre con las subpoblaciones CD8), granulocitos, células NK, mastocitos (que contienen al TNF en sus gránulos), astrocitos, fibroblastos, adipocitos, queratinocitos, células del músculo liso, células de Kupffer, células de la granulosa y ciertos tipos de tumores de ovario y mama. <sup>(24, 25, 84)</sup>

La producción del TNF se desencadena por una amplia variedad de agentes, entre ellos el LPS, virus, protozoarios, complejos inmunes, citocinas (como IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-1, IL-2, CSF-1), células tumorales, proteínas del complemento (C5a), neuropéptidos, activadores de proteínas cinasas (como ésteres de forbol), inhibidores de proteínas fosfatasa (ácido okádico), especies reactivas de oxígeno y factor activador de plaquetas. <sup>(11, 49, 50, 79, 106)</sup>

Se trata del producto de un gen único de 3.6 kb, contiene tres intrones y cuatro exones de los cuales el cuarto codifica para el 80% de la proteína madura; esta localizado en el brazo corto del cromosoma 6 dentro de la región HLA clase IV (6p21.31). Existe un 30% de homología entre el TNF y la linfotóxina alfa, por lo que se cree que ambos genes se derivan de uno solo que presentó un evento ancestral de duplicación el cual existió hace millones de años; entre ambos genes existe una distancia de 1 kb. <sup>(17, 34, 63, 109)</sup>

El TNF se expresa como un trimero proteico transmembranal no glicosilado de 233 aminoácidos cada unidad (aproximadamente 26 kD), se orienta como una proteína de membrana tipo II, es decir, el extremo aminoterminal es intracelular, el segmento transmembranal está cerca del extremo aminoterminal y el gran segmento carboxiloterminal es extracelular. <sup>(9, 28, 50, 51, 106, 110)</sup>

El TNF es proteolíticamente procesado en la unión de los residuos alanina 76-valina 77 por TACE (enzima convertasa de TNF), una metaloproteasa, esta enzima transmembranal es miembro de la familia de las adamalisin (ADAM-17), tiene actividad de serinoproteasa y es encontrada en la cara externa de la membrana plasmática, da origen al

TNF maduro el cual es un polipéptido homotrimérico moderadamente hidrofóbico de 157 aminoácidos y con un peso aproximado de 17 kD por cada subunidad, la valina es el primer aminoácido, contiene además dos cisteínas en las posiciones 69 y 101 que forman un puente disulfuro intracatenario, carece de residuos de metionina y presenta dos residuos de triptófano altamente conservados los cuales se cree que son de importancia estructural más que funcional, su punto isoelectrico es de 5.3. (4, 9, 12, 27, 51, 71, 73, 75, 79, 88, 107)

La ausencia de algún sitio potencial de N-glicosilación en la secuencia de aminoácidos, indica que no es una glicoproteína. (10, 11, 24, 84, 97)

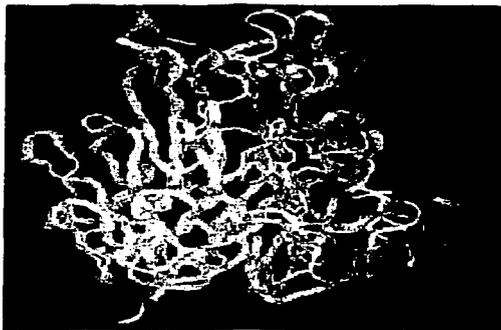


Figura 1. Modelo de listón que representa la forma activa del TNF humano. (108)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Estudios cristalográficos han revelado que el TNF activo es una molécula homotrimérica de aproximadamente 52 kD, adopta una forma piramidal la cual resulta del arreglo de cada monómero que consta de dos láminas  $\beta$ -plegadas, cada una con ocho cadenas  $\beta$  antiparalelas con topología en collar de perlas y con inserción aminoterminal que contiene tres cadenas- $\beta$  adicionales. La lámina exterior es rica en residuos hidrofílicos (parte polar), la hoja interna es hidrofóbica y contiene el segmento carboxiloterminal el cual está localizado dentro del eje central del trímero, interaccionan de manera no covalente dando estabilidad a la estructura. Cada subunidad tiene un peso de 17 kD con aproximadamente 60 Å de largo y 30 Å de ancho (figura 1). Los lugares de unión al receptor se encuentran en la base de la pirámide permitiendo la unión simultánea a más de un receptor. (1, 11, 38, 51, 70, 102, 106, 108)

### 3.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

El TNF es mediador tanto de la inmunidad innata como de la específica, es un importante nexo de unión entre la respuesta inmune específica y la inflamación aguda, su función depende de la concentración plasmática a la que se encuentra en el organismo, por lo que se requiere de un control riguroso en su expresión génica; los niveles normales de TNF en suero son de 5 pg/mL. Cuando se producen cantidades pequeñas, actúa localmente como un regulador paracrino y autocrino provocando que:

- a) Las células endoteliales vasculares expresen nuevos receptores de superficie (moléculas de adhesión) provocando que los leucocitos se adhieran a ellas, encontrando primero a los neutrófilos y posteriormente a los monocitos y linfocitos. Estas acciones contribuyen a la acumulación de tales células en los focos inflamatorios y probablemente sean los efectos locales fisiológicos más importantes.
- b) Estimula a los fagocitos mononucleares y a otros tipos celulares a la secreción de quimiocinas contribuyendo así al reclutamiento de leucocitos.
- c) Activa a las células inflamatorias para que destruyan microorganismos.
- d) Actúa como factor de angiogénesis, induciendo la formación de nuevos vasos, así como un factor de crecimiento para los fibroblastos, provocando el depósito de tejido conectivo.
- e) Contribuye a las reacciones inflamatorias locales que son dañinas para el huésped, como en el caso de la autoinmunidad.
- f) Ejerce un efecto protector contra virus, similar al del interferón. (1, 29, 34, 93)

Cuando se encuentra en el torrente sanguíneo en grandes cantidades actúa como una hormona endocrina de las siguientes formas:

- a) Como un pirógeno endógeno que actúa sobre las células de las regiones reguladoras del hipotálamo para inducir fiebre, ya que estimula la síntesis de prostaglandinas en las células del hipotálamo.
- b) Actúa sobre los fagocitos mononucleares y quizá sobre las células endoteliales vasculares para estimular la secreción de IL-1 e IL-6 a la circulación.
- c) Induce a los hepatocitos a aumentar la síntesis de ciertas proteínas séricas, como la proteína A del amiloide sérico.

- d) Activa el sistema de la coagulación, principalmente por alteración del equilibrio de las actividades procoagulantes y anticoagulantes del endotelio vascular.
- e) Suprime la división de las células madre en la médula ósea. <sup>(1, 29, 31, 81, 85)</sup>

A concentraciones extremadamente elevadas, (como en la sepsis por bacterias Gram-negativas) tiene los siguientes efectos letales:

- a) Reduce la perfusión tisular por depresión de la contractibilidad miocárdica, al parecer induce el aumento en la actividad de la enzima de los miocitos cardíacos denominada óxido nítrico sintetasa (NOS) la cual, transforma la arginina en citrulina y nitrosilo (NO), este último inhibe la contractibilidad miocárdica.
- b) Disminuye aún más la presión sanguínea ya que actúa directamente sobre las células del músculo liso e indirectamente estimula a las células endoteliales para producir vasodilatadores, prostaciclina y NO.
- c) Produce trombosis intravascular, lo que lleva a una disminución de la perfusión tisular, esto se debe a una combinación de alteraciones del endotelio y de los fagocitos mononucleares que favorecen la coagulación, y a la activación de neutrófilos para formar agregados, lo que da lugar al taponamiento de los vasos por parte de estas células.
- d) Produce alteraciones metabólicas graves, como la reducción de la concentración de glucosa plasmática debido a la utilización excesiva de éste carbohidrato por el músculo y a la incapacidad del hígado para reponerlo. <sup>(1, 29, 31, 81, 85, 93, 119)</sup>

Lo anterior muestra que el TNF es una citocina pleiotrópica, ya que en algunas ocasiones los efectos locales mejoran los mecanismos de defensa del huésped, incrementando la función de las células del sistema inmune y estimulando la inflamación. Pero en otros casos, su acción biológica puede causar lesiones en los tejidos. <sup>(106)</sup>

### 3.4 RECEPTORES

Las acciones del TNF se observan tras la unión del trimero soluble a los receptores de superficie presentes en algunas células, se trata de proteínas transmembranales tipo I, existen dos diferentes con pesos moleculares de 55 kD (TNFR1, p55 o CD120a) y 75 kD (TNFR2, p75 o CD120b), tienen una carga neta positiva; cada uno es codificado por genes ubicados en diferentes cromosomas (12 y 1 respectivamente), la primer proteína contiene

455 residuos de aminoácidos (aa), consta de tres dominios, uno extracelular con 190 aa, uno transmembranal con 25 y uno citoplasmático con 220; el segundo receptor contiene 461 residuos de aa, formado por un dominio extracelular, uno transmembranal y uno citoplasmático de 240, 27 y 173 residuos respectivamente. El dominio extracelular de ambos contiene el sitio de unión al TNF, es una región rica en residuos de cisteína (24 para TNFR1 y 22 para TNFR2), presentan una homología de 28% y a su vez está organizada en cuatro segmentos; el dominio transmembranal de los receptores es de un solo cruce y pequeño mientras que, el dominio intracelular es totalmente diferente en ambos tipos lo cual sugiere que se encuentran involucrados en diferentes señales de transducción; se ha encontrado que el dominio citoplasmático del TNFR1 contiene sitios potenciales de fosforilación dependientes de AMPc, proteína cinasa C y tirosina cinasa, en cambio TNFR2 carece de ellos. La afinidad del TNF por su receptor es inusualmente baja para una citocina, con una  $K_d$  de aproximadamente  $5 \times 10^{-10}$  M de unión al receptor TNFR2 y de  $1 \times 10^{-9}$  M para el TNFR1; sin embargo, el TNF se sintetiza en grandes cantidades y puede saturar fácilmente a sus receptores y de esta manera formar un complejo que será rápidamente internalizado gracias a la fosforilación mediada por proteína cinasa C, vía la formación de una vesícula cubierta por clatrina, para posteriormente ser degradado por los lisosomas, lo que implica que los receptores no son reciclados y se requiere de la síntesis de ellos para mantener un equilibrio en el número de receptores sobre la superficie de las células. (25, 46, 51, 112)

Ambos receptores están presentes sobre la membrana plasmática de casi todos los tipos celulares en diferentes cantidades y proporciones (no existen en eritrocitos). Se han encontrado en concentraciones altas en hígado, riñón, células endoteliales y bazo, existen en cantidades moderadas en estómago, duodeno, páncreas, colon y esófago. La presencia del TNFR2 está más restringida ya que principalmente se ubica en células de origen hematopoyético. (1, 20, 27)

Se han encontrado fragmentos solubles de ambos receptores tanto en orina como en suero humano, fueron identificados originalmente como péptidos inhibidores del TNF pero ahora se sabe que son porciones truncadas del dominio extracelular de los receptores los cuales pueden unirse a la citocina y regular la viabilidad de ella en el organismo. (1, 20, 27, 35, 50, 51, 79, 89, 94, 104, 105, 106, 110)

Estudios con anticuerpos contra los receptores del TNF han demostrado que el TNFR1 lleva a cabo la mayoría de las actividades pleiotrópicas activadas por la citocina, incluyendo citotoxicidad, proliferación de fibroblastos y células endoteliales, síntesis de prostaglandina E2, actividad antiviral, inducción del ARNm de la manganeso superóxido dismutasa,

producción de  $\beta 2$  integrina, potenciación de la fagocitosis vía Fc, y la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Mediante mutaciones en el dominio intracelular del TNFR1, se ha identificado un dominio de aproximadamente 80 residuos de aminoácidos hacia el extremo carboxiloterminial del receptor, así como una región de 221 residuos que se requiere para que se inicie la señal citotóxica, lo que ha demostrado la importancia de este dominio en mediar las señales del TNF. (26, 42, 70, 92, 104)

También se encontró un dominio de activación de la esfingomielinasa neutra (NSD) el cual contiene 11 residuos de aa adyacentes al extremo aminoterminal del dominio de muerte. El TNFR2 se encuentra involucrado en el desarrollo de células T y en la proliferación de linfocitos citotóxicos. (26, 28, 50)

### 3.5 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

La secuencia de sucesos que siguen a la interacción del TNF con sus receptores y a su posterior internalización celular aún no se conoce con precisión, hasta el momento, las observaciones en líneas celulares sugieren cinco etapas (figura 2):

- 1) La formación de complejos protéicos heteroméricos que incluyen a ambos receptores del TNF con proteínas acopladoras como FADD (proteína asociada al dominio de muerte Fas, factor apoptótico soluble), TRADD (proteína asociada al dominio de muerte de TNFR1), DD (dominio de muerte, localizado en la porción citoplásmica del receptor el cual programa una señal de apoptosis, presente solo en TNFR1) y FAN (factor asociado con la activación de la esfingomielinasa neutra), además de proteínas cinasas como RIP (proteína que interactúa con el receptor) y proteasas de la familia de las caspasas como FLICE (proteína homóloga de FADD). (28, 109)

En esta primera etapa se escinde más de una vía de transducción; una asociada a la muerte celular por apoptosis dependiente de FLICE, y otra asociada a los cambios de expresión génica dependientes de RIP. (28, 55, 64, 69, 109)

Otra familia de proteínas que se asocian con los miembros de la familia de receptores de TNF es conocida como TRAFs (factores asociados a TNFR). TRAF1 y TRAF2 de 45 y 56 kD respectivamente fueron co-purificadas en asociación al TNFR2; TRAF3 fue identificada como una proteína de 64 kD. Estas tres proteínas comparten homología en su extremo carboxiloterminial que se encuentra altamente conservado, están involucradas en la supervivencia y proliferación celular. (28, 45, 50, 69, 101)

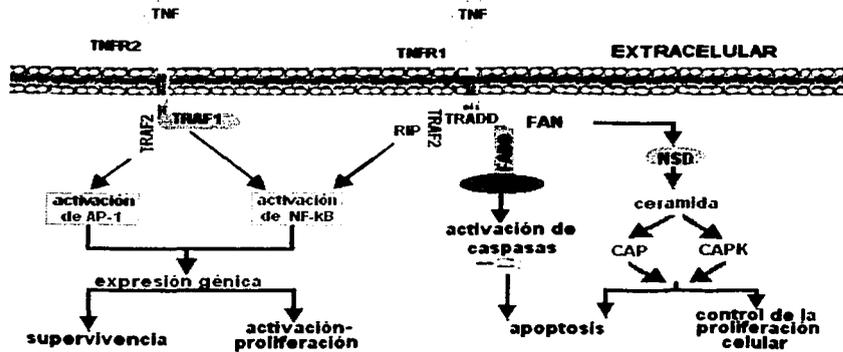


Figura 2. Representación esquemática de la transducción de señales desencadenadas por la unión del factor de necrosis tumoral a sus receptores. <sup>(101)</sup>

- 2) Se ha identificado la interacción entre el receptor TNFR1 y el factor asociado con la activación de esfingomielinasa neutra (FAN), ésta última es una proteína formada por 917 residuos de aa, pertenece a una familia que se caracteriza por poseer al menos cuatro secuencias repetidas de asparagina-triptofano las cuales parecen ser la parte estructural que facilita la interacción proteína-proteína de manera específica. La región del FAN que se requiere para la asociación con el receptor TNFR1 se localiza hacia el extremo carboxiloterminar, este segmento contiene cuatro de las cinco partes repetidas de asparagina-triptofano lo que hace suponer que, la interacción con el receptor TNFR1 es mediada por tal porción, encontrándola involucrada en la activación de una esfingomielinasa, que desencadena un efecto citostático y en ocasiones citotóxico. La activación de esta esfingomielinasa resulta en un aumento en el recambio de esfingolípidos de membrana que da origen a segundos mensajeros como la ceramida y sus productos metabólicos como la esfingosina y la esfingalina. <sup>(18, 50)</sup>
- 3) La rápida activación de cascadas de transducción en la que participan proteínas cinasas como JUNK y la proteína cinasa dependiente de ceramida (CAPK), proteína fosfatasa

citosolica del tipo A2 dependiente de ceramida (CAP), y proteasas solubles de la familia de la convertasa de interleucina 1 (ICE-1). <sup>(15, 110, 111)</sup>

- 4) La activación de la transcripción mediada por factores como el factor nuclear  $\kappa$ B y la proteína AP-1 implicados en cambios en la expresión génica. <sup>(15, 18, 69)</sup>
- 5) Paralelo a estos cambios se produce un aumento en la producción de radicales libres y consecuentemente estrés oxidativo. La cadena respiratoria mitocondrial es un componente importante en la generación de tal estrés el cual forma parte de la transducción de señales dependientes de TNFR1 vía NF- $\kappa$ B. <sup>(18, 21, 32, 101)</sup>

### 3.6 POLIMORFISMO

En cada especie existe una enorme diversidad de alelos diferentes para cada locus del MHC; de hecho es el complejo de genes más polimórfico en vertebrados siendo esta la región donde se encuentra el factor de necrosis tumoral. <sup>(54)</sup>

El elevado número de polimorfismos reportados en la región promotora del TNF y diversos estudios, han determinado que influyen en la expresión génica de la citocina, afectando así en cierto grado, a la susceptibilidad o severidad de padecer algunas enfermedades. <sup>(3, 5, 34)</sup>

Existen datos de 10 loci polimórficos en el promotor, los cuales se encuentran en las posiciones -1031, -863, -857, -851, -419, -376, -308, -238, -163 y -49. Los ubicados en el lugar -419, -163 y -49 son raros de encontrar. Se suma a los polimorfismos anteriores el encontrado en la posición +488 del primer intrón. En estos polimorfismos existe la sustitución de un nucleótido por otro, la mayoría de ellos constan de un cambio de guanina por adenina, con excepción de los ubicados en -419 (guanina por citosina), -851 (citosina por timina), -857 (citosina por adenina), -863 (citosina por adenina) y -1031 (timina por citosina). <sup>(5, 43, 63, 100)</sup>

Existen reportes de 2 polimorfismos de inserción/delección, uno de ellos es el que se encuentra en la posición +691 del primer intrón donde hay delección de guanina; el segundo es una inserción de citosina en la posición +70 del primer exón (figura 3). <sup>(14, 43)</sup>

Se ha investigado la influencia de algunos polimorfismos ubicados en el promotor del TNF los cuales afectan los niveles transcripcionales, tal es el caso del -863, a la variante alélica se le ha asociado con un 31% menos de la actividad transcriptional. Se encontró que, sujetos homocigotos para el alelo -863A tienen concentraciones bajas de TNF en suero en comparación con sujetos heterocigotos para tal alelo. <sup>(100)</sup>

El polimorfismo  $-238$  también influye en los niveles de producción de la citocina, se ha observado que individuos con  $-283$  G/A producen significativamente más TNF que individuos homocigotos G/G. <sup>(96)</sup>

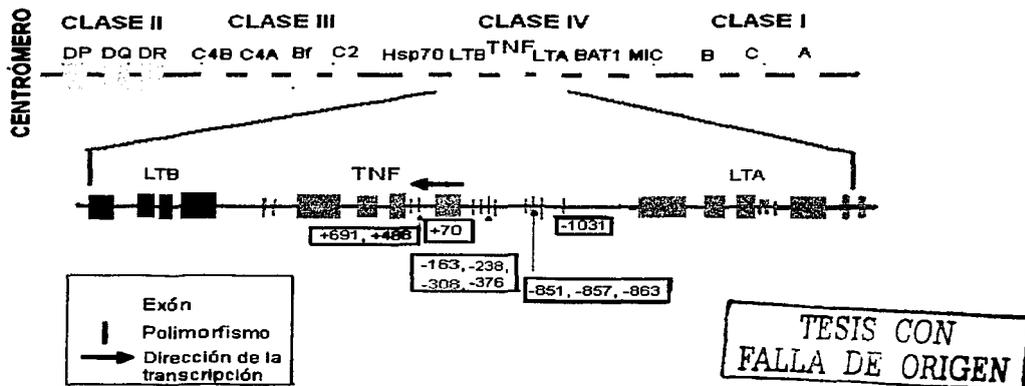


Figura 3. Localización en el cromosoma 6 humano del factor de necrosis tumoral mostrando los polimorfismos más importantes. <sup>(43)</sup>

El polimorfismo más estudiado es el  $-308$ , del que se ha descrito que posee algún control sobre la transcripción del ARNm de la proteína en estudio. En este alelo hay una sustitución de un nucleótido de guanina (TNF1) por uno de adenina (TNF2). El alelo TNF2 es un activador transcripcional mucho más poderoso que el alelo común, o también llamado silvestre TNF1; existen estudios donde se muestra la frecuencia alélica de éste polimorfismo en diferentes poblaciones y donde a la variante alélica se le atribuyen implicaciones funcionales importantes principalmente asociadas a enfermedades (tabla 1). <sup>(3, 7, 33)</sup>

Se ha observado que la variante alélica, TNF2, afecta la unión de factores de transcripción en la región  $-308$ , siendo responsable de los niveles séricos elevados de la citocina en los individuos que portan dicho alelo, contribuyendo así a una inapropiada función del sistema inmune, se cree que es debido a que la región  $-308$  actúa como elemento cis-suplente en el contexto del promotor del gen. <sup>(2, 59, 60, 66, 86, 115)</sup>

Tabla 1. Distribución alélica del polimorfismo -308 del TNF en diferentes poblaciones estudiadas. (7)

TNF -308	FRECUENCIA ALÉLICA				
	Mestizos mexicanos	Mexicanos	Tailandeses	Japoneses	Caucásicos
TNF1	90.4	97.2	90.5	92.2	84.0
TNF2	9.6	2.8	9.4	1.8	16.0

Las comparaciones en la producción del TNF de las células de individuos con el genotipo -308 G/G contra individuos con el genotipo -308 G/A han revelado que el grado de aumento en la producción de la citocina puede variar en aproximadamente un 20 a 40%. (5, 100)

Algunos informes han demostrado que un solo polimorfismo dentro de la región promotora del TNF puede alterar la transcripción y la proporción del gen debido a cambios en la estructura del ADN afectando así la entrada de proteínas que participan en este proceso biológico; está comprobado que en citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión, la expresión génica se encuentra modulada por la unión de factores de transcripción a determinadas secuencias las cuales se encuentran ubicadas por lo general en el promotor. (116)

Como la actividad biológica del TNF está en función a su concentración en el organismo, quizá un 5% de diferencia en los niveles producidos localmente puedan alterar la respuesta inmune, se ha señalado que parece aumentar su propia producción por un mecanismo de realimentación positiva y por consiguiente, un pequeño incremento en su síntesis puede magnificarse considerablemente durante una respuesta inmune *in vivo* teniendo efectos significativos. (5, 60)

### 3.7 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El TNF es producido *de novo* después de la activación de algunos tipos celulares, su biosíntesis se controla a diferentes niveles; la región flanqueada 5' del gen influye en la transcripción pues contiene el promotor "TATA" encontrado a 20 pb del extremo 5' del sitio de transcripción, otras secuencias reguladores externas también influyen en el proceso, esto incluye al factor nuclear  $\kappa$ B, elementos dependientes de AMPc y los sitios de unión a c-jun/AP-1. Está demostrado que en la región promotora del la citocina, específicamente entre los nucleótidos -323 y -285, hacia el extremo 5' se encuentra una secuencia de 10 pb

homóloga al sitio consenso de unión de la proteína activadora 2 (AP-2), tal región actúa como una estructura que modula la transcripción; el promotor también contiene entre -101 y -125 pb una secuencia similar a la de la proteína activadora 1 (AP-1) la cual está involucrada en su regulación autocrina. <sup>(39, 62, 65, 83, 87, 103)</sup>

A nivel post-transcripcional, la expresión del gen parece depender en parte de secuencias que residen dentro del segmento 3' no traducido, éste contiene una secuencia en tándem del octámero TTATTTAT. La secuencia rica en uracilo-adenina del ARNm le confiere inestabilidad y bloqueo traduccional acortando el tiempo de vida media debido a la presencia de ribonucleasas presentes en macrófagos y otros tejidos que reconocen de manera selectiva la secuencia UUAUUUAU provocando la destrucción del ARNm que la contienen. <sup>(11, 16, 36, 44, 59, 61, 79, 83, 89, 106, 115)</sup>

Los intrones también juegan un papel importante en los eventos de transcripción, principalmente el tercer intrón que contiene de manera conservada secuencias de algunos factores de transcripción.

Se ha demostrado que, la estructura de la cromatina influye en la expresión génica, esto se ha visto principalmente en la región promotora donde la unión específica con factores de transcripción se ve alterada. <sup>(83)</sup>

### **3.8 RELACIÓN CON ENFERMEDADES**

La localización del TNF dentro del HLA hace pensar que tiene un papel importante en la etiología de enfermedades ligadas a este, en particular aquellas con un componente inflamatorio o autoinmune. <sup>(19, 59)</sup>

Estudios recientes indican que los efectos inflamatorios del TNF son el pivote para que se desarrolle inflamación cerebral durante la meningitis o bien del desarrollo de placas en pacientes que padecen esclerosis múltiple. <sup>(30, 106)</sup> Se ha demostrado la importancia del TNF en la obesidad y en la resistencia a la insulina. <sup>(100)</sup> Enfermedades asociadas con niveles elevados, como el caso de la malaria o la diabetes mellitus no insulino dependiente, involucran a los macrófagos y monocitos en el proceso de la enfermedad. <sup>(2, 52)</sup> Los efectos del TNF sobre el endotelio vascular contribuyen al daño de tejidos en patologías como la coagulación intravascular diseminada. <sup>(67)</sup>

La presencia del polimorfismo en la posición -308 se le a asociado con la malaria cerebral y con la susceptibilidad a padecer lepra lepromatosa, leishmaniasis mucocutánea,

neumonitis por hipersensibilidad y enfermedad de Crohn; en cambio al polimorfismo –238 se le asocia con la artritis reumatoide. (43, 66, 100)

### **3.8.1 Factor de necrosis tumoral y fibrosis pulmonar idiopática**

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI), se caracteriza porque en la pared alveolar se encuentra la acumulación de matriz extracelular e incremento de macrófagos activados, estos factores desencadenan la producción de TNF, en pacientes con dicha patología está incrementada la producción del ARNm de tal citocina la cual posteriormente servirá como quimiocina para fibroblastos, células del músculo liso, monocitos, células epiteliales tipo II y neutrófilos, además regula la producción de colágena y fibronectina. Se ha observado que el TNF puede inducir la proliferación masiva de fibroblastos involucrándola como un factor importante que contribuye al desarrollo de la fibrosis pulmonar. (74, 76, 109, 118)

## IV. FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

### 4.1 ANTECEDENTES

Las neumopatías intersticiales difusas, o enfermedades fibrosantes del pulmón, son un conjunto de padecimientos respiratorios subagudos y crónicos heterogéneos que, como su nombre lo indica, se caracterizan por comprometer difusamente al parénquima pulmonar, afectando primordialmente al intersticio y espacio alveolar. <sup>(98, 99)</sup>

Una característica común de estas entidades es la presencia de inflamación como respuesta a un estímulo dañino, que posteriormente será acompañado por cicatrización del parénquima pulmonar, lo que conduce a fibrosis, esta última es favorecida por la destrucción de la membrana basal y por agentes que impiden la reepitelización adecuada. La consecuencia de tales procesos patológicos es la fibrosis del pulmón con un aumento en la retracción elástica y disminución de la distensibilidad, considerando desde el punto de vista funcional, el patrón restrictivo característico de la enfermedad pulmonar intersticial. <sup>(77, 98, 99)</sup>

Existen más de 150 diferentes enfermedades y/o agentes agresores que son capaces de producir algún tipo de neumopatía intersticial difusa, a pesar de su heterogeneidad, pueden agruparse por presentar rasgos clínicos, radiológicos y funcionales similares; morfológicamente comparten el hecho de responder, después de un daño inicial, con un proceso inflamatorio intersticial e intraalveolar difuso (cuyas características varían de enfermedad a enfermedad), el cual es seguido por fibrosis y destrucción de las unidades alveolo-capilares. <sup>(98)</sup>

Las neumopatías intersticiales difusas pueden subclasificarse en aquellas de causa conocida y desconocida; la más frecuente de causa desconocida, es la fibrosis pulmonar idiopática; es la enfermedad pulmonar intersticial más agresiva en términos de que es habitualmente progresiva, incapacitante y letal en un periodo breve de tiempo, se ha reportado que en individuos caucásicos esta representa de un 25 a un 30% de todos los casos de afección a nivel pulmonar, se trata de una entidad que algunas veces es confundida con la tuberculosis, ocurre en aproximadamente el 30% de los pacientes. A pesar de que se han desarrollado numerosos estudios en modelos animales y en muestras pulmonares de pacientes con la enfermedad, la secuencia de los eventos que suceden durante la patogenia no se conocen aún con precisión. <sup>(57, 90, 98, 99)</sup>

## 4.2 DEFINICIÓN DE LA PATOLOGÍA

La FPI es un proceso inflamatorio de carácter crónico que afecta al pulmón, se caracteriza por inflamación del parénquima pulmonar (alveolitis) y fibrosis intersticial progresiva, hay deposición de matriz extracelular y proteínas, principalmente colágena, como ya ha sido mencionado, la enfermedad es de etiología desconocida. En algunos pacientes, el diagnóstico de FPI se basa en criterios clínicos y radiológicos confirmando con estudios histológicos. La compleja relación entre macrófagos/linfocitos/neutrófilos así como la acción local de citocinas, interaccionan de manera autocrina y paracrina coordinando así la inflamación y la fibrogénesis. (22, 68, 74, 82, 90) Como resultado se tiene una dificultad en la oxigenación de la sangre. En condiciones extremas, el paciente morirá con un pulmón fibrótico en estado terminal. (13, 53, 95, 118)

Los síntomas incluyen tos seca o con expectoración mucosa, hiporexia, astenia y baja de peso; conforme progresa la enfermedad la respiración se vuelve el mayor de los problemas. Las actividades diarias como subir escalones, caminar distancias cortas e incluso hablar y comer se complica y a veces es casi imposible, el paciente es más susceptible a adquirir infecciones. En fases avanzadas de la enfermedad puede necesitarse oxígeno todo el tiempo, la falta de él puede causar hipertensión pulmonar ocasionando cianosis con edema. La enfermedad puede llevar a la muerte, principalmente por hipoxemia o bien por un ataque cardíaco (embolia). (58, 72, 78, 95, 98)

El diagnóstico se basa tomando en cuenta varios criterios como:

- a) Historia clínica: debe de constar de un cuidadoso interrogatorio incluyendo el tipo de exposiciones en el medio ambiente y en el ámbito profesional.
- b) Examen físico completo: a la auscultación se escuchan estertores bronquioalveolares bilaterales, de predominio basal, es frecuente encontrar hipocratismo digital asintomático.
- c) Pruebas de función respiratoria: revelan alteraciones en las propiedades mecánicas de predominio restrictivo con reducción de los volúmenes pulmonares y de la distensibilidad. De esta manera, en el estudio de la mecánica ventilatoria se aprecia una disminución de la capacidad vital forzada, disminución de la capacidad pulmonar total y el volumen residual. Aunque la obstrucción al flujo en las vías aéreas mayores es rara, han sido descritas alteraciones patológicas con repercusión funcional en las vías aéreas periféricas, esto es, bronquiolos membranosos y respiratorios. Durante el ejercicio se incrementa la hipoxemia y aquí parece participar en alguna medida un trastorno en la difusión de los gases.

- d) Pruebas serológicas: se encuentra un aumento en la velocidad de eritrosedimentación e hipergammaglobulinemia, asimismo, aumentan los anticuerpos antinucleares, el factor reumatoide, crioglobulinas y complejos inmunes circulantes, estos últimos han sido descritos en porcentajes variables en los pacientes.
- e) El estudio radiológico: muestra generalmente un patrón de imágenes reticulares finas bilaterales de predominio basal con acortamiento de los campos pulmonares, debido a una reducción del volumen pulmonar. Si la enfermedad es diagnosticada en estadios tempranos, se puede observar opacidades en vidrio despulido (presumiblemente provocado por la alveolitis). Cuando el padecimiento progresa hacia el pulmón en estado terminal, aparecen imágenes quísticas que originan el llamado pulmón en panal de abeja, el cual es un mal pronóstico. La FPI se caracteriza por la presencia de opacidades reticulares localizadas fundamentalmente en las regiones subpleurales y en las bases pulmonares. El predominio periférico (subpleural) de las lesiones se observa en la gran mayoría de los enfermos independientemente de si la enfermedad se encuentra en estadios tempranos o avanzados y constituye un hallazgo bastante característico.
- f) Broncoscopia con lavado bronquioalveolar: muestra un incremento variable en el porcentaje de neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, basófilos, linfocitos T, hay aumento en la proporción de fibroblastos y depósito de complejos inmunes.
- g) Biopsia pulmonar: muestra una variación llamativa entre zonas pulmonares continuas, frecuentemente se encuentran áreas con paredes alveolares con un severo espesor seguidas de áreas normales; esto causa continuamente controversias acerca de la interpretación histológica. Con el uso de microscopía electrónica, se determina que las paredes alveolares gruesas están compuestas de numerosos alvéolos los cuales se colapsaron después de que el epitelio fue destruido. (13, 37, 98)

### 4.3 EPIDEMIOLOGÍA

En México así como en otros países en vías de desarrollo no se cuenta con reportes estadísticos certeros acerca de la prevalencia de la FPI, aunque este padecimiento suele ser una de las neumopatías intersticiales difusas más frecuentes diagnosticadas en los centros hospitalarios; en un periodo de 12 años en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, se han diagnosticado 2,465 nuevos casos y se observa una predilección por el sexo femenino de 2:1. Algunos investigadores estiman que existen 6 casos por cada 100,000 individuos al año y con una sobrevivencia, después del diagnóstico, de 2 a 5 años. En 1972

la organización para enfermedades respiratorias estimó que la FPI ocupa el 15% de la consulta en el área de neumología. <sup>(96)</sup>

En 1980, en Nuevo México, se reportaron 11,000 admisiones hospitalarias por esta enfermedad de un total de 89,000 pacientes con fibrosis. Este padecimiento ha tenido un incremento substancial en los últimos años siendo su forma más común, entre los cuarenta y setenta años de edad, aunque puede ocurrir ocasionalmente en niños y adultos jóvenes, en los caucásicos, contrario a lo observado en la población mexicana, se encuentra un predominio por el sexo masculino con una relación de 2:1, por otra parte se ha descrito la forma familiar de la enfermedad, donde más de uno de sus miembros se encuentra afectado, lo cual sugiere la existencia de una susceptibilidad genética a padecerla aunque el modo de transmisión no es del todo claro se ha sugerido que puede ser autosómica dominante con penetrancia variable, sin que hasta el momento se haya encontrado un gen específico en su transmisión. No se ha comprobado que exista predilección racial. <sup>(22, 23, 37, 68, 90, 95, 117)</sup>

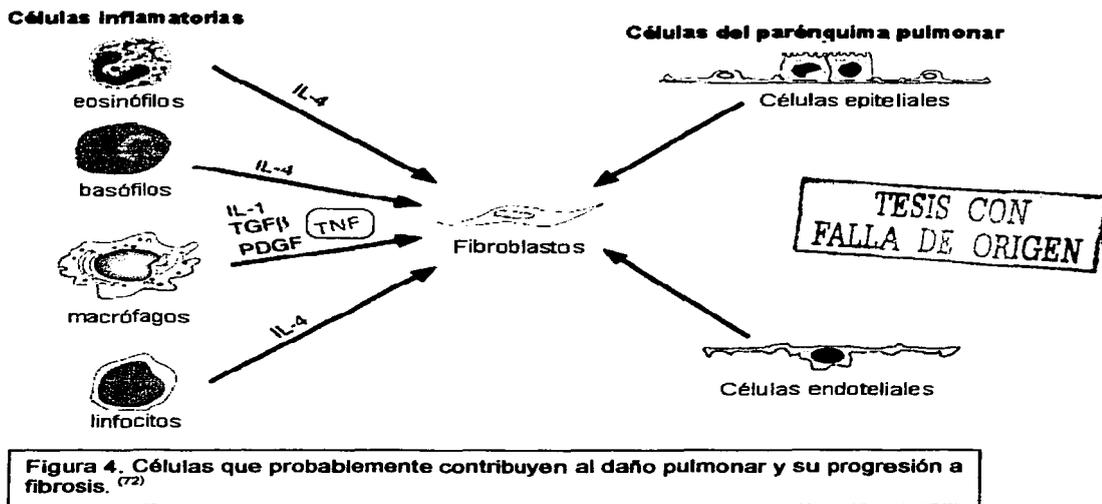
#### **4.4 INMUNOPATOGÉNESIS**

En teoría, un agente activa una serie de eventos los cuales inducen a una reacción inflamatoria en el pulmón que perpetúa y causa la fibrosis progresiva del parénquima, por lo que la fibrosis es el resultado de varios tipos de respuestas proliferativas e inflamatorias, la presencia de fibroblastos lleva a la deposición irreversible de colágena. Se tiene la hipótesis de que la fibrosis es precedida por la infiltración al pulmón de células inmunes e inflamatorias (figura 5). <sup>(22, 90, 91, 95, 113)</sup>

Al inicio de la lesión, las paredes alveolares son dañadas encontrándose tapizadas por neumocitos de tipo I y II; las estructuras intersticiales de sostén están constituidas por células mesenquimatosas, sobre todo fibroblastos, miofibroblastos y colágena; también puede llegar a afectarse el endotelio capilar. El proceso no altera vías respiratorias altas aunque puede haber bronquiolitis, la cual puede afectar unidades alveolares. <sup>(22, 118)</sup>

Normalmente existen células inmunitarias entremezcladas o recubriendo a los alvéolos, como macrófagos alveolares, macrófagos dendríticos, monocitos intersticiales, linfocitos y células inflamatorias como polimorfonucleares y eosinófilos. <sup>(22, 118)</sup> Son estas células inflamatorias las que tienen un papel crucial en la inflamación crónica y en el daño continuo al parénquima pulmonar ya que liberan citocinas en respuesta a la lesión y se presume que son mediadores cruciales de la fibrogénesis. La compleja interacción entre células inflamatorias, citocinas y otros mediadores como proteínas coagulantes, matriz

extracelular y fibroblastos afectan y regulan la respuesta fibrogénica. Los mecanismos que perpetúan la reacción inflamatoria no han sido del todo elucidados. (22, 74, 118)



En la lesión alveolar inicial tiene lugar un aumento de la permeabilidad de los neumocitos tipo I y de las células endoteliales adyacentes, que dan lugar a edema intersticial alveolar así como, a la formación de membranas hialinas intraalveolares. Con la persistencia de la enfermedad, la biopsia pulmonar muestra aumento de la permeabilidad alveolocapilar y descamación de las células alveolares (alveolitis), y fibrosis intersticial.

El proceso antes mencionado, también se refleja en la composición de las células y enzimas del líquido del lavado bronquioalveolar y en los componentes celulares presentes en la biopsia pulmonar. La enfermedad tiene una distribución heterogénea pues existen cambios continuos inflamatorios y fibróticos en todo el parénquima pulmonar. (22, 74, 118)

Se encuentran implicadas numerosas citocinas en la patogénesis de la FPI, incluyendo el TGF-β (factor de crecimiento transformante beta), el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), IL-1β, IL-6, IL-4, IL-8, se incrementa la expresión de TNF

por células epiteliales tipo II. Los agentes oxidantes y proteinasas tales como colagenasa y neutrófilo elastasa, tienen un papel importante en el daño al parénquima pulmonar; por tal motivo, aumenta la probabilidad de que exista predisposición genética a padecer FPI, siendo los más importantes y estudiados los polimorfismos de genes para citocinas proinflamatorias y algunos de sus receptores, las moléculas de histocompatibilidad y enzimas reparadoras de ADN. (68, 74, 82, 90, 91)

En la patología, la expresión del TNF se incrementa por la infiltración de monocitos, así como por células epiteliales tipo II; se ha encontrado que la citocina juega un papel importante en la acumulación de matriz extracelular y en la proliferación de fibroblastos. Se estima que en un 60% la producción protéica está determinada a nivel génico estimulando de manera directa a neutrófilos y provocando un incremento en los niveles de AMPc, proteínas cinasa y elevando de manera temprana los niveles de ARNm de los proto-oncogenes c-fos y c-myc, los cuales están asociados a eventos de G1 del ciclo celular.<sup>(47, 56, 82, 118)</sup>

## **V. HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

### **5.1 HIPÓTESIS**

"Existe una relación entre el polimorfismo del factor de necrosis tumoral en las posiciones -238 y -308 con el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática."

### **5.2 JUSTIFICACIÓN**

La prevalencia de la fibrosis pulmonar idiopática se desconoce, sin embargo es una de las neumopatías intersticiales difusas más frecuentes representando el prototipo más agresivo de dichos padecimientos, por lo que el presente trabajo está enfocado a determinar el polimorfismo del factor de necrosis tumoral, principalmente para conocer más acerca de los aspectos genéticos de la enfermedad y por tanto definir si existen genes de alto riesgo que conducen a ciertos individuos de la población a desarrollar fibrosis pulmonar idiopática.

### **5.3 OBJETIVO GENERAL**

Definir los alelos del factor de necrosis tumoral en las posiciones –238 y –308 en un grupo de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y un grupo de sujetos sanos, estableciendo las diferencias significativas operantes.

### **5.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 5.4.1 Establecer en base a las diferencias genéticas entre pacientes y sujetos sanos la posible susceptibilidad de padecer fibrosis pulmonar idiopática.
- 5.4.2 Emplear el polimorfismo como marcador genético que contribuye a que un individuo sea susceptible a padecer fibrosis pulmonar idiopática.
- 5.4.3 Conocer la prevalencia genotípica de las variantes del factor de necrosis tumoral en las posiciones –238 y –308 en pacientes y sujetos sanos.

## VI. METODOLOGÍA

### 6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

#### ➤ POBLACION EN ESTUDIO:

##### Tamaño de la muestra

Para el estudio se incluyeron 105 sujetos los cuales se dividen en dos grupos; el primero de ellos consta de individuos que en un periodo de un año acudieron al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y se les diagnosticó de forma certera fibrosis pulmonar idiopática; el segundo grupo está formado por sujetos sanos captados durante un periodo de aproximadamente un mes y que aceptaron de forma voluntaria participar en éste protocolo de investigación.

GRUPO PROBLEMA: 50 pacientes

GRUPO CONTROL: 55 sujetos clínicamente sanos

#### a) GRUPO PROBLEMA.

Se tipificaron 50 pacientes mestizos mexicanos con fibrosis pulmonar idiopática.

##### Criterios de inclusión:

1. Pacientes con fibrosis pulmonar idiopática que están de acuerdo en participar en el estudio.
2. Pacientes con diagnóstico certero de fibrosis pulmonar idiopática (clínico, radiológico e histológico).
3. No padecer, o haber padecido enfermedades asociadas al sistema HLA.
4. Sujetos pertenecientes a la población mestiza mexicana, no relacionados entre sí.

#### b) GRUPO CONTROL.

Se analizaron 55 sujetos pertenecientes a la población mestiza mexicana clínicamente sanos.

##### Criterios de inclusión:

1. Clínicamente sanos.

2. Mestizos mexicanos.
3. No tener parentesco con individuos pertenecientes al grupo problema ni entre sí.
4. No padecer, o haber padecido enfermedades asociadas al sistema HLA.

#### ➤ MUESTRA BIOLÓGICA EMPLEADA

Como muestra biológica se obtuvo sangre periférica de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y de personas sanas, extraída por punción venosa utilizando como anticoagulante EDTA. En la elección de pacientes se solicitó la colaboración de los médicos de consulta externa del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, los cuales realizaron historias clínicas, pruebas físicas, radiológicas y de laboratorio para llegar al diagnóstico certero de la enfermedad.

### 6.2 EXTRACCIÓN DE ADN

A partir de una muestra de sangre periférica, eliminar los eritrocitos realizando lisis mediante un choque hipotónico. Enseguida liberar el ADN mediante lisis con detergentes iónicos como el dodecil sulfato de sodio (SDS). La eliminación de proteínas y nucleasas se logra incubando la muestra con proteinasa K para posteriormente efectuar extracciones orgánicas con fenol/cloroformo que separa el ácido nucleico en la fase acuosa y el resto de los componentes en la fase orgánica. La obtención de ADN finalmente se logra precipitando con isopropanol absoluto para su posterior cuantificación espectrofotométrica por absorción de radiación ultravioleta. <sup>(6, 33, 40)</sup>

### 6.3 AMPLIFICACIÓN DE ADN POR PCR-RFLP

El término "reacción en cadena de la polimerasa", PCR, se aplica al proceso bioquímico *in vitro*, mediante el cual una secuencia específica de ADN se puede seleccionar y amplificar, obteniéndose así múltiples copias a partir de la original. El método de polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP, restriction fragment length polymorphism) consiste en identificar un gen o alelo específico para posteriormente digerirlo con una endonucleasa que reconoce secuencias específicas en el ADN, que dan lugar a fragmentos de diferentes tamaños. Estos fragmentos se separan por electroforesis en un gel de agarosa.

En este trabajo el sitio de restricción enzimático fue incorporado en uno de los iniciadores empleados para cada polimorfismo, introduciendo un solo cambio de base. <sup>(33, 45, 114)</sup>

Los componentes básicos requeridos para una PCR son:

ADN de interés

Iniciadores específicos (tablas 2 y 3)

Mezcla de deoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's)

Solución amortiguadora de reacción

ADN polimerasa

Cloruro de magnesio

Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos que son:

- 1) Desnaturalización, en el cual se separan, o desnaturalizan las dos cadenas complementarias del ADN. (95°C por 12 a 15 minutos)
- 2) Alineación, en el cual se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de ADN blanco desnaturalizado (la temperatura empleada en este caso depende de los iniciadores).
- 3) Extensión, en donde la DNA polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados al ir polimerizando los deoxinucleótidos trifosfatados libres, resultando nuevas cadenas complementarias a las dos sencillas presentes al inicio de la reacción. (72°C entre 20 y 60 segundos)
- 4) Extensión final, el paso final para extender la cadena se adiciona después de que se completó el ciclo. (72°C por 7 a 10 minutos). <sup>(33, 40)</sup>

Método.

♣ Condiciones de reacción. <sup>(100, 114)</sup>

Las concentraciones de cada reactivo utilizadas para determinar los polimorfismos estudiados se encuentran descritas en la tabla 4. Es importante agregar a cada muestra 15 µL de aceite mineral para evitar la evaporación. La secuencia de los iniciadores empleados para cada polimorfismo se anotan en las tablas 2 y 3 respectivamente, el ciclaje para la amplificación de ADN se encuentran en las tablas 5 y 6 según el polimorfismo a estudiar. <sup>(100,</sup>

114)

Tabla 2. Secuencias de los iniciadores empleados para el polimorfismo TNF-308.

INICIADOR EMPLEADO	TNF -308
Sentido	5' AGG CAA TAG GTT TTG AGG <u>GCC</u> AT
Antisentido	5' TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG

Tabla 3. Secuencias de los iniciadores empleados para el polimorfismo TNF -238.

INICIADOR EMPLEADO	TNF -238
Sentido	5' AAA CAG ACC ACA GAC CTG GTC
Antisentido	5' CTC ACA CTC CCC ATC CTC <u>CCG</u> GAT C

Tabla 4. Mezcla reactiva para llevar a cabo la PCR de cada polimorfismo a estudiar.

REACTIVO EMPLEADO	POLIMORFISMO -308	POLIMORFISMO -238
dNTP's	0.2 mM	0.2 mM
Amortiguador de PCR	1X	1X
Cloruro de magnesio	3 mM	1.5 mM
Iniciador sentido	1 pmol/ $\mu$ L	1.2 pmol/ $\mu$ L
Iniciador antisentido	1 pmol/ $\mu$ L	1.2 pmol/ $\mu$ L
Taq polimerasa	0.025 UI/ $\mu$ L	0.040 UI/ $\mu$ L
ADN	100 ng/ $\mu$ L	100 ng/ $\mu$ L
Agua libre de DNasa y RNasa	cbp 25 $\mu$ L	cbp 25 $\mu$ L

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 6.4 VISUALIZACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO

La electroforesis en gel de agarosa, es un método estándar utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN con base a la migración de las moléculas según su peso molecular y carga en un campo eléctrico. La técnica es simple y rápida de realizar y capaz de separar fragmentos de ADN que no pueden ser resueltos adecuadamente por otros procedimientos, tal como centrifugación por gradiente de densidad. <sup>(6, 33, 40)</sup>

La localización del ADN en el gel se determina directamente por tinción con bromuro de etidio, el cual tiene afinidad para intercalarse en el ADN y fluorecer con la luz ultravioleta. <sup>(6, 33, 40)</sup>

Tabla 5. Condiciones de ciclaje para el polimorfismo TNF-308.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
94	5 minutos	1
94	40 segundos	35
60	40 segundos	
72	40 segundos	
72	10 minutos	1

Tabla 6. Condiciones de ciclaje para el polimorfismo TNF-238.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
94	3 minutos	1
94	30 segundos	35
59	1 minuto	
72	2 minutos	
72	10 minutos	1

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Preparación de las muestras y electroforesis.

1. Colocar 5  $\mu\text{L}$  del amplificado en un tubo de PCR (tener cuidado de no llevar aceite mineral) y colocar 5  $\mu\text{L}$  de colorante de carga, mezclar con cuidado. Refrigerar el resto del amplificado.
2. Colocar las muestras cuidadosamente en cada pozo del gel
3. Colocar en un pozo el marcador de peso molecular de 25 pb de ADN (1 $\mu\text{L}$  de marcador por cada 10  $\mu\text{L}$  de colorante de carga).
4. Aplicar una corriente de 350 volts durante 30 minutos.
5. Colocar el gel en el transiluminador y visualizar con luz UV.
6. Para el polimorfismo -308 se espera una banda de 107 pb y para el -238 una de 155 pb.

### 6.5 DIGESTIÓN ENZIMÁTICA Y VISUALIZACIÓN DE PRODUCTOS

Una vez visualizada la banda esperada de cada polimorfismo colocar la enzima de restricción respectiva según el polimorfismo a identificar (tabla 7) realizando la mezcla reactiva indicada en la tabla 8; mezclar suavemente cada tubo y tomar 15  $\mu\text{L}$  del amplificado anterior (tener precaución de no llevarse aceite mineral) y agregar 3  $\mu\text{L}$  de la mezcla que contiene la enzima. Incubar 24 horas a 37°C, colocar 15  $\mu\text{L}$  de aceite mineral.

Tabla 7. Enzimas de restricción empleadas para identificar los polimorfismos del TNF.

POLIMORFISMO	ENZIMA
-238	BamH I
-308	Nco I

Para visualizar los productos de digestión enzimática, se emplea un gel de agarosa 1000 por ser de mayor resolución debido a que los fragmentos de ADN esperados son pequeños.

Preparación de las muestras para electroforesis.

1. Tomar 15  $\mu\text{L}$  del digerido y 5  $\mu\text{L}$  de colorante de carga, mezclar suavemente.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 8. Mezcla de reactivos empleados para poder llevar a cabo la digestión de los amplificadores.

REACTIVO	VOLUMEN EMPLEADO ( $\mu\text{L}$ )
Enzima de restricción	0.5
Amortiguador	2.0
Agua libre de DNasa y RNasa	0.5

- Colocar las muestras cuidadosamente en cada pozo del gel y el marcador de peso molecular.
- Aplicar una corriente de 350 volts durante 30 minutos.
- Colocar el gel en el transiluminador y revelar con luz UV.
- La determinación de los polimorfismos presentes en cada muestra depende del tamaño de los fragmentos obtenidos siguiendo lo especificado en las tablas 9 y 10.

Tabla 9. Tamaño de los productos esperados para el polimorfismo TNF-308.

POLIMORFISMO -308	PRODUCTOS ESPERADOS
TNF1	87 y 20 pb
TNF2	107 pb

Tabla 10. Tamaño de los productos esperados para el polimorfismo TNF-238.

POLIMORFISMO -238	PRODUCTOS ESPERADOS
TNFG	155 pb
TNFA	130 y 25 pb

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los resultados, y la significancia estadística de las diferencias entre los grupos en estudio se realizó utilizando análisis de  $\chi^2$  mediante el auxilio de tablas de contingencia de  $2 \times 2$ , con ayuda del software Epi Info 6 y del Ingeniero Luis Silva Maldonado

del departamento de matemáticas de la facultad de química de la UNAM. Los valores de p fueron corregidos según Yates y tomando en consideración las siguientes herramientas estadísticas:

1. Frecuencia antigénica (FA)- Es la proporción de sujetos del total de un grupo que son portadores de un determinado antígeno. Esta se calcula en porcentaje y su fórmula es:

$$FA = \frac{\text{número de sujetos positivos a determinado alelo}}{\text{número total de sujetos}} (100)$$

2. Frecuencia génica (FG)- Se calcula a partir de la FA, la cual se toma en números absolutos mediante la fórmula de Haldane:

$$FG = 1 - \sqrt{1 - FA}$$

3.  $\chi^2$  cuadrada ( $\chi^2$ )- Determina que tan significativa es la asociación HLA enfermedad. Es decir, si la probabilidad de asociación es debida al azar o bien significativa. (Indica si entre ambas poblaciones existe o no dependencia).

Mediante una tabla de contingencia de 2 x 2 se calculan tanto el riesgo relativo como la  $\chi^2$  de un grupo de pacientes a fin de compararlo con un grupo control (tabla 11).

Tabla 11. Tabla de contingencia de 2 x 2 para la prueba de  $\chi^2$

	CON LA VARIANTE ALÉLICA	SIN LA VARIANTE ALÉLICA	TOTAL
Pacientes	a	b	M <sub>1</sub>
Grupo control	c	d	M <sub>2</sub>
Total	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	N

$$\chi^2 y = \frac{(ad - bc - \frac{N}{2})^2 N}{M_1 \cdot M_2 \cdot M_3 \cdot M_4}$$

Dónde:

- a = Pacientes con el alelo de interés.
- b = Pacientes sin el alelo de interés.
- c = Controles con el alelo de interés.
- d = Controles sin el alelo de interés.
- M<sub>1</sub> = a + b
- M<sub>2</sub> = c + d

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

$$M_3 = a + c$$

$$M_4 = b + d$$

4. Riesgo relativo (RR).- Indica cuántas veces es más frecuente la enfermedad en individuos portadores de un alelo respecto a los que carecen de él. Un riesgo relativo mayor de 1 indica que el alelo es más frecuente en los pacientes que en los controles; mientras que un riesgo relativo menor de 1 indica una asociación negativa.

$$RR = \frac{a/(a+b)}{c/(c+d)}$$

5. Razón de momios (OR).- Indica si el factor de riesgo está asociado o no a la enfermedad. Si tiene un valor de cero, indica que no hay asociación entre el factor de riesgo y el estado de una enfermedad, un valor menor a 1 indica una probabilidad baja de padecer la enfermedad en el sujeto que posee el factor de riesgo y un valor mayor a 1 indica una alta probabilidad de padecer la enfermedad cuando un individuo posee el factor de riesgo.

$$RR = \frac{a \cdot d}{c \cdot b}$$

VII. RESULTADOS

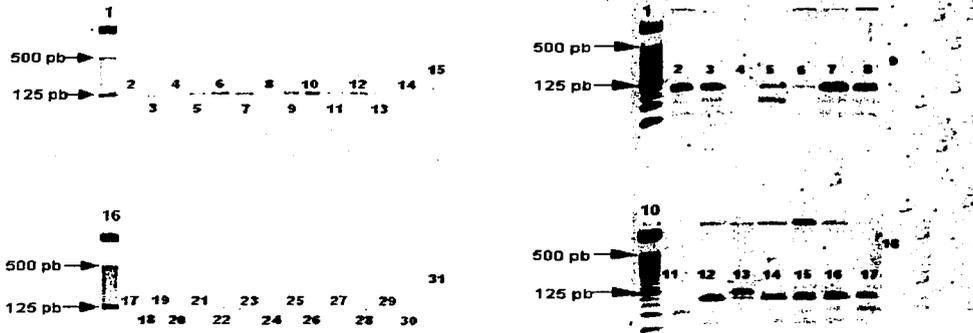


Figura 5. Detección del polimorfismo TNF-308 por PCR-RFLP.

En este estudio se incluyeron a 105 sujetos los cuales fueron divididos en dos grupos: 55 sujetos sanos, seleccionados al azar pertenecientes a la población mestiza mexicana los cuales constituyen el grupo control y 50 individuos mestizo mexicanos con diagnóstico certero de fibrosis pulmonar idiopática. A todos ellos se les tomó una muestra de sangre periférica para la tipificación del promotor del gen del factor de necrosis tumoral en las posiciones -238 y -308 por el método de PCR-RFLP.

En la figura 5, a la izquierda, se muestra la amplificación del polimorfismo -308: los carriles 1 y 16 contienen los marcadores de peso molecular; el carril 2 tiene un control de reacción (ADN, genotipo -308 1/1) y los carriles 3 al 14 y 17 al 30 contienen las muestras en estudio presentan la banda de 107 pb la cual indica que la reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo de manera satisfactoria, con excepción de las muestras de los carriles 18, 19 y 30 donde se produce un bandedo débil por lo que es necesario rectificar la concentración de ADN para posterior amplificación; en los carriles 15 y 31 se colocó control de reactivos. A la derecha de la figura, se observa la digestión enzimática por Nco I de las muestras ya amplificadas. Los carriles 1 y 10 contiene el marcador de peso molecular, en aquellos identificados con los números 9 y 18 se encuentra el control de reactivos; se puede observar en el carril 13 la presencia del genotipo TNF -308 1/2 ya que se observan las bandas de

107, 87 e incluso la de 20 pb, en el resto de los carriles que contiene las muestras digeridas presentan las bandas de 87 y 20 pb lo que indica que se trata del genotipo de TNF –308 1/1.

Al analizar las frecuencias génicas y antigénicas de los alelos del polimorfismo –308 del factor de necrosis tumoral en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, podemos observar que el alelo TNF2 se encuentra significativamente incrementado en este grupo en comparación con la población control, en esta última, el alelo presenta una frecuencia génica de 0.03% en comparación con el alelo silvestre que está presente en una frecuencia de 0.97%. Por otro lado, el alelo TNF1 en el grupo de pacientes tiene una frecuencia génica de 0.59%, lo cual hace suponer que la presencia del alelo silvestre en el grupo de individuos sanos puede conferir cierta protección a desarrollar la enfermedad; mientras que el alelo TNF2, probablemente predispone al desarrollo de la misma o bien a que una persona portadora de esta variante alélica desarrolle una forma más severa de respuesta a la inflamación llegando a progresar rápidamente hacia la fibrosis, en cuanto al valor de  $\chi^2$ , indica que las variables se encuentran relacionadas de manera dependiente; al analizar el riesgo relativo, se observa que el alelo TNF1 puede funcionar como un alelo de protección en los individuos que lo presentan, no así para aquellos que poseen el alelo TNF2, lo cual indica que, existe una gran asociación entre la presencia de ésta variante alélica y la enfermedad y por consiguiente la razón de momios para dicho alelo se encuentra incrementada en comparación con el alelo silvestre (tabla 12).

El genotipo heterocigoto (1/2) del polimorfismo –308 del factor de necrosis tumoral en el grupo de pacientes presenta un riesgo relativo elevado al compararlo con el grupo control, ya que tal genotipo se encontró presente en 41 de 50 individuos enfermos, lo cual puede sugerir que la principal contribución para conferir susceptibilidad a desarrollar la enfermedad está dada por el alelo TNF2 ya que el genotipo homocigoto silvestre (1/1) no tiene al parecer ninguna relevancia en este padecimiento, encontrándose presente en sólo 9 de los 50 pacientes estudiados, mientras que el genotipo homocigoto para la variante alélica (2/2), en la población en estudio no fue presentada por ningún individuo de la muestra poblacional lo cual coincide con reportes previos donde tal genotipo es poco frecuente entre los individuos de la población (tabla 13).

Al comparar las frecuencias génicas y antigénicas del polimorfismo –238 del factor de necrosis tumoral entre el grupo de individuos con fibrosis pulmonar idiopática y el grupo control se observa que el alelo TNFA se encuentra incrementado de forma significativa en el grupo de pacientes, sugiriendo que es un factor importante de riesgo, el cual puede contribuir

al desarrollo de la enfermedad, en cambio en el grupo de sujetos sanos la presencia de este alelo es muy baja presentando una frecuencia génica de 0.05% en comparación con la variante silvestre de este mismo grupo que tiene una frecuencia del 0.95%, mientras que el alelo silvestre, TNFG se encuentra disminuido en el grupo de pacientes al compararlo con el grupo control, presentando una frecuencia génica de 0.45%; tomando en cuenta el valor de  $\chi^2$ , se encuentra que ambas poblaciones están relacionadas entre si de manera dependiente y en cuanto al valor del riesgo relativo y la razón de momios confirman que la variante alélica (TNFA) confiere un factor de riesgo considerable en la enfermedad cuando un individuo presenta dicho alelo (tabla 14).

Analizando los genotipos del polimorfismo -238 del factor de necrosis tumoral se observa que en el caso de los pacientes, el genotipo heterocigoto (G/A) presenta un riesgo relativo muy elevado lo cual indica que el alelo TNFA contribuye a la susceptibilidad de padecer la enfermedad, el riesgo relativo cuando el individuo presenta el genotipo homocigoto (A/A), también es considerable, aunque éste último fue menos frecuente en nuestra población estudiada, ya que en el grupo de pacientes sólo 8 de los 50 individuos lo presentaron, mientras que en el grupo control estuvo presente en 1 de los 55 individuos que participaron en el estudio, por lo que se considera que la presencia del alelo TNFA, es un factor de riesgo importante para la susceptibilidad de padecer fibrosis pulmonar idiopática, no importando si se encuentra en homocigosis o heterocigosis en un individuo, está comprobado que la producción del factor de necrosis tumoral está determinada genéticamente en función de la presencia o ausencia de la variante alélica. En cuanto al genotipo silvestre (G/G) sugiere que no existe relación entre éste y el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática, sino que más bien confiere cierto carácter de protección cuando está presente puesto que en el grupo control se encontró en 51 de los 55 individuos considerados para el estudio, mientras que en el grupo de pacientes sólo se encontró en 3 de los 50 estudiados (tabla 15).

Tabla 12. Frecuencia antigénica (FA) y génica (FG) de los alelos de TNF -308 en pacientes con FPI y el grupo control.

TNF -308	Pacientes (n = 100)			Grupo control (n = 110)			p <sup>c</sup>	χ <sup>2</sup>	RR	OR (95% IC)
	n	FA	FG (%)	n	FA	FG (%)				
TNF1	59	1.18	0.59	107	1.90	0.97	< 0.0001	44.04	0.61	0.04 (0.01-0.14)
TNF2	41	0.82	0.41	3	0.06	0.03	< 0.0001	44.04	15.03	24.8 (6.95-105.07)

Tabla 1. Genotipos del polimorfismo de TNF -308 en pacientes con FPI en comparación con el grupo control.

TNF -308	Pacientes (n = 50)		Grupo control (n = 55)		p <sup>c</sup>	χ <sup>2</sup>	RR	OR (95% IC)
	n	%	n	%				
1/1	9	18	52	94.5	< 0.0001	59.93	0.19	0.01 (0.00-0.06)
1/2	41	82	3	5.5	< 0.0001	59.93	15.03	78.96 (17.8-409.59)
2/2	0	---	0	---	---	---	---	---

Donde: χ<sup>2</sup> = valor de ji cuadrada, p = probabilidad, RR = riesgo relativo;  
OR = razón de momios e IC = intervalo de confianza

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 14. Frecuencia antigénica (FA) y génica (FG) de los alelos de TNF -238 en pacientes con FPI y el grupo control.

TNF -238	Pacientes (n = 100)			Grupo control (n = 110)			p <sup>c</sup>	$\chi^2$	RR	OR (95% IC)
	n	FA	FG (%)	n	FA	FG (%)				
TNFG	45	0.9	0.45	105	1.90	0.95	< 0.0001	62.89	0.47	0.04 (0.01-0.11)
TNFA	55	1.1	0.55	5	0.09	0.05	< 0.0001	62.89	12.10	25.76 (9.07-78.35)

Tabla 15. Genotipos del polimorfismo de TNF -238 en pacientes con FPI en comparación con el grupo control.

TNF -238	Pacientes (n = 50)		Grupo control (n = 55)		p <sup>c</sup>	$\chi^2$	RR	OR (95% IC)
	n	%	n	%				
G/G	3	6	51	92.7	< 0.0001	75.43	0.06	0.01 (0.00-0.03)
G/A	39	78	3	5.5	< 0.0001	54.45	14.3	61.50 (14.37-306.45)
A/A	8	16	1	1.8	0.013	5.03	8.8	10.3 (1.22-227.85)

Donde:  $\chi^2$  = valor de ji cuadrada, p = probabilidad, RR = riesgo relativo;  
OR = razón de momios e IC = intervalo de confianza

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VIII. DISCUSIÓN

La fibrosis pulmonar idiopática es caracterizada por una inflamación crónica del parénquima pulmonar, aunque es de etiología desconocida, existen observaciones clínicas y experimentales que sugieren la existencia de una probable susceptibilidad genética a desarrollarla. Experimentos donde a los ratones se les induce a desarrollar fibrosis muestran que existen mediadores proinflamatorios críticos para llegar a tal estado. Se han propuesto genes que codifican mediadores proinflamatorios importantes en esta enfermedad tales como TNFR-II, IL-6, IL-1, algunos genes ubicados en el MHC, etc. Sin embargo, los resultados han sido contradictorios.

En este trabajo, se analizó la relación entre el factor de necrosis tumoral y la fibrosis pulmonar idiopática ya que existen estudios previos que muestran que tal citocina juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. Se conoce que la actividad biológica del factor de necrosis tumoral depende de su concentración sanguínea. A bajas concentraciones, mejora los mecanismos de defensa del huésped incrementando la función de las células del sistema inmune y estimulando la inflamación. Por otro lado, a concentraciones muy elevadas, causa lesiones en los tejidos llegando a ser letal. Reportes previos han descrito la existencia de polimorfismos puntuales en el promotor del gen los cuales influyen a nivel transcripcional, dentro de los polimorfismos más estudiados se encuentra el ubicado en la posición -308 que se asocia a enfermedades como la malaria cerebral, leishmaniasis, artritis, colitis ulcerativa, neumonitis por hipersensibilidad y fibrosis pulmonar idiopática. Otro polimorfismo menos estudiado pero que se ha demostrado que está asociado en enfermedades como la artritis reumatoide es el -238. Al examinar el polimorfismo TNF -308 en una población británica se reportó ausencia de asociación entre la variante alélica y la fibrosis pulmonar idiopática, sin embargo, en una población italiana, se reportó asociación entre el alelo TNF2 y el desarrollo de la enfermedad. Basándose en lo anterior, se propuso a éste gen como candidato a ser estudiados en pacientes mestizos mexicanos con el diagnóstico de fibrosis pulmonar idiopática.

Al analizar los resultados del polimorfismo -308 del factor de necrosis tumoral en la población mexicana, se encuentra un incremento significativo del alelo TNF2 en el grupo de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, lo cual hace suponer que la presencia de éste

facilita el desarrollo de la enfermedad ya que sujetos heterocigotos con el genotipo 1/2 también presentan una frecuencia estadística significativa.

Por otro lado, al comparar las frecuencias del polimorfismo -238 del factor de necrosis tumoral en nuestro grupo en estudio y la población control se observa un incremento importante en la frecuencia del alelo TNFA en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática al compararlo con el grupo control y al analizar los genotipos encontramos que la combinación GA predomina principalmente en el grupo de pacientes lo cual sugiere que la presencia del alelo TNFA también es importante para el desarrollo de la enfermedad.

Es importante mencionar que la fibrosis pulmonar idiopática, es una enfermedad donde junto con los estímulos del medio ambiente, intervienen otros genes diferentes al del factor de necrosis tumoral y que el desequilibrio de enlace que existe entre éste y otros genes involucrados en la alteración de la homeostasia pulmonar también interfieren en el desarrollo de la misma.

La significancia biológica de componentes genéticos asociados a la fibrosis pulmonar idiopática requiere de futuras evaluaciones, con el objetivo de identificar que otros mediadores proinflamatorios y que interacciones entre los alelos pueden contribuir a la susceptibilidad de progresar hacia fibrosis pulmonar y así, caracterizar blancos terapéuticos para el tratamiento de ella.

## **IX. CONCLUSIONES**

- ⊗ El análisis molecular de los genes del factor de necrosis tumoral reveló que los alelos TNF2 -308 y TNFA -238 se encuentran estrechamente asociados con el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática.
  
- ⊗ Los genotipos TNF -308 1/2 y TNF -238 G/A ubicados en el promotor del gen, sugieren un papel clave que probablemente indiquen un efecto conjunto de ambos polimorfismos en el desarrollo de la enfermedad.
  
- ⊗ Hay una fuerte asociación entre la elevada expresión de mediadores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral y el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática.
  
- ⊗ La convergencia temporal tanto de múltiples factores genéticos entre ellos el factor de necrosis tumoral, como factores extrínsecos activadores pueden desencadenar fibrosis pulmonar idiopática.

## X. APÉNDICE

### 10.1 MATERIAL Y EQUIPO

- Equipo completo para extracción de sangre
- Gradillas
- Probetas de diferentes volúmenes
- Matraces aforados de diferentes volúmenes
- Vasos de precipitados de diferentes volúmenes
- Pipetas Pasteur
- Pipetas desechables de 5 mL
- Pipetas automáticas de 0.2 a 1000  $\mu\text{L}$
- Tubos para microcentrifuga de 1.5 mL
- Tubos cónicos de 15 mL de polipropileno
- Tubos para PCR de 0.2 mL
- Parrilla de calor graduable y agitación constante (CORNING)
- Agitador orbital (Thermolyne)
- Agitador Vortex (modelo K-550-G)
- Balanza analítica (Ohaus)
- Baño de agua con agitación constante (GYROMAX 939)
- Espectrofotómetro DU640 (Beckman)
- pHmetro (ORION)
- Campana de extracción de gases (LABCONCO)
- Campana de flujo laminar horizontal (Veco)
- Centrifuga refrigerada (Modelo TJ-6 Beckman)
- Microcentrifuga (modelo 5415 Eppendorf)
- Termociclador modelo 9700 (Perkin-Elmer)
- Equipo de electroforesis horizontal mini submarino (Hoefer)
- Fuente de poder (modelo 4001P)
- Transiluminador de luz UV onda corta (UVP)
- Cámara fotográfica (Polaroid DS-34 Kodak)

## 10.2 REACTIVOS

- ~ Solución amortiguadora de lisis para eritrocitos
- ~ Solución amortiguadora de lisis para leucocitos
- ~ Solución salina de citratos 20X/L
- ~ Fenol saturado equilibrado (Sigma)
- ~ Fenol/cloroformo
- ~ Cloroformo/alcohol isoamilico
- ~ Amortiguador TBE 10X (Gibco BRL)
- ~ Isopropanol absoluto (Sigma)
- ~ Etanol al 70% (Merck)
- ~ Agua libre de DNasa y RNasa (Sigma)
- ~ Aceite mineral
- ~ Bromuro de etidio (Sigma)
- ~ Solución colorante de carga
- ~ Agarosa y agarosa 1000 (GibcoBRL)
- ~ Marcador de ADN de 25 pares de bases (GibcoBRL)
- ~ Deoxinucleótidos trifosfatados 0.2 mM (GibcoBRL)
- ~ Amortiguador para PCR 10X (GibcoBRL)
- ~ Cloruro de magnesio 50 mM (GibcoBRL)
- ~ Iniciadores (GibcoBRL)
- ~ Taq DNA polimerasa recombinante 5 UI/ $\mu$ L (GibcoBRL)
- ~ Enzimas de restricción (GibcoBRL).
  - Nco I 10 U/ $\mu$ L
  - BamH I 10 U/ $\mu$ L

## 10.3. PREPARACIÓN DE REACTIVOS <sup>(6, 33, 40)</sup>

- ~ Solución amortiguadora de lisis para eritrocitos

- Tris-HCl, pH 7.6 (Sigma)	0.01M
- MgCl <sub>2</sub> (Sigma)	0.005M
- NaCl (Sigma)	0.01M

Mezclar todos los reactivos en agua libre de DNasa y RNasa de 18 meghoms (Sigma), aforar a un litro y guardar la solución a temperatura ambiente.

~ Solución amortiguadora de lisis para leucocitos

- Tris-HCl, pH 7.6 (Sigma)	0.01M
- EDTA, pH 8.0 (Sigma)	0.01M
- NaCl (Sigma)	0.05 M
- SDS (Sigma)	0.2%
- Proteinasa K (GibcoBRL)	300 mg/μL

Disolver por separado el Tris-HCl en un volumen mínimo de agua libre de DNasa y RNasa y ajustar el pH a 7.6 utilizando HCl o NaOH según se requiera.

Preparar el EDTA en un volumen mínimo de agua libre de DNasa y RNasa y ajustar el pH a 8.0. En un matraz aforado estéril de un litro mezclar las dos soluciones anteriores adicionando el NaCl, la proteinasa K y el SDS, disolver todos los reactivos hasta obtener una solución homogénea; el SDS provoca espuma, por lo que no se debe aforar sino hasta que esta haya desaparecido. Esterilizar por filtración. Guardar la solución en alícuotas de 150 mL para almacenar y en alícuotas de 20 mL para uso constante, ambas a -20°C.

~ Solución salina de citratos (SSC) 20X/L

- NaCl (Sigma)	3.0M
- Citrato de sodio (Sigma)	0.3M

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 10M en 800 mL de agua destilada y aforar a un litro.

~ Fenol saturado equilibrado (Sigma)

Antes de usar el fenol debe equilibrarse a un pH mayor de 7.8, ya que el ADN puede permanecer en la fase orgánica (fenólica) si el pH se encuentra ácido. El fenol bidestilado se debe almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Cuando se prepara el fenol equilibrado se funde a  $68^{\circ}\text{C}$ , en baño María. Al fenol líquido adicionar 8-hidroxiquinoleína (Sigma) a una concentración final de 0.1%. La 8-hidroxiquinoleína es un antioxidante, inhibidor parcial de RNAsa y un quelante débil de iones.

Añadir un volumen igual de Tris-HCl 0.5M, pH 8.0 a temperatura ambiente. Agitar con barra magnética 15 minutos, remover la fase acuosa. Repetir hasta que la fase fenólica alcance un pH mayor de 7.8.

Una vez equilibrado el fenol, remover la fase acuosa y adicionar un volumen de 0.1 mL de Tris-HCl 0.1M, pH 8.0 el cual contiene 0.2 % de 2-mercaptoetanol (Sigma). Guardar en frasco ámbar a  $4^{\circ}\text{C}$  por periodos no mayores de un mes.

~ Fenol/cloroformo.

Para preparar el fenol/cloroformo debe eliminarse la fase superior del fenol saturado o tomar solamente la fase fenólica y mezclar cantidades iguales de fenol saturado y cloroformo/alcohol isoamílico (Sigma). Mezclar, dejar a  $4^{\circ}\text{C}$  toda la noche y utilizar la fase inferior.

~ Cloroformo/alcohol isoamílico

Tomar 24 partes de cloroformo puro (Sigma) y añadir una parte de alcohol isoamílico (Sigma), mezclar y guardar a  $4^{\circ}\text{C}$ .

~ TBE 10X (Gibco BRL)

- Tris-base	1.0 M
- Ácido bórico	0.9 M
- EDTA	0.01M

~ Preparación de gel de agarosa al 2%

1. En un vaso de precipitado se coloca agarosa y TBE 0.5X, para disolver la mezcla se expone al calor con agitación constante.

2. En el momento en que se encuentra completamente disuelta la agarosa, adicionar el bromuro de etidio (10mg/mL) a razón de 2  $\mu$ l por cada 100 mL de gel.
3. Esta solución se deja enfriar entre 50 a 55°C para verter en la charola que debe estar nivelada para obtener una capa de gel uniforme.
4. Cuando se logra la gelificación, a temperatura ambiente, colocar el gel en la cámara de electroforesis.
5. El gel es cubierto con TBE 0.5X como solución amortiguadora de corrimiento.

#### **10.4. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN** <sup>(6, 33, 40)</sup>

##### ◆ Lisis celular

1. La muestra de sangre periférica anticoagulada con EDTA se centrifuga durante 5 minutos a 2500 rpm, con el fin de separar el paquete globular, del plasma.
2. Con una pipeta Pasteur desechable transferir cuidadosamente la capa de leucocitos a un tubo cónico de 15 mL de polipropileno, (no importa si pasan algunos eritrocitos).
3. Agregar 10 mL de solución de lisis para eritrocitos y agitar suavemente.
4. Centrifugar durante 15 minutos a 3000 rpm a 4°C, desechar cuidadosamente el sobrenadante.
5. Repetir los pasos 3 y 4 hasta obtener leucocitos libres de eritrocitos.
6. Resuspender el botón blanco obtenido en 1 mL de SSC 1X y en 4 mL de solución de lisis para leucocitos.
7. Incubar la muestra de 18 a 24 horas en baño de agua a 53°C en agitación constante.

##### ◆ Extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico

1. Continuar trabajando con el mismo tubo que se dejó incubando.
2. Añadir 5 mL de una solución de fenol saturado.
3. Agitar durante 10 minutos de manera suave.
4. Centrifugar a 3000 rpm a 4°C por 15 minutos.
5. Enseguida obtener la fase acuosa (superior) colocándola en un tubo nuevo de 15 mL de polipropileno.
6. Nuevamente añadir 5.0 mL de fenol saturado, como segunda extracción y colocar la fase acuosa obtenida después de la centrifugación en otro tubo nuevo de 15 mL.

7. Realizar dos extracciones con fenol/cloroformo (v/v), colocando la fase acuosa en tubos nuevos de 15 mL.
  8. Realizar una última extracción con cloroformo/alcohol isoamilico (v/v).
  9. Colocar la fase acuosa en un tubo nuevo de 15 mL.
- ▲ Precipitación con isopropanol absoluto
1. Añadir 5 mL de isopropanol absoluto.
  2. Agitar el tubo suavemente hasta que el ADN precipite.
  3. El ADN flotante se recoge con la punta de una varilla de vidrio a la cual previamente fue cerrada.
  4. Lavar el ADN sumergiendo 10 veces la punta de la varilla en etanol frío al 70%.
  5. Secar el ADN colocando la varilla de forma invertida en una gradilla.
  6. Resuspender el ADN en 200  $\mu$ L de agua libre de DNasas y RNasas sumergiendo la punta de la varilla hasta que resbale.
  7. Para lograr la hidratación del ADN incubar a 4°C por lo menos dos días o en agitación constante a 65°C de 2 a 3 horas.

## 10.5. CUANTIFICACIÓN DE ADN <sup>(6, 33, 40)</sup>

Existen varios métodos para detectar la presencia de ADN en una solución. Uno de los más utilizados, es el de espectrofotometría por absorción de radiación UV. El ADN absorbe la radiación UV a una longitud de onda de 260 nm, hay que tener en cuenta que 1 OD (densidad óptica) corresponde a 50 mg/mL para ADN de doble cadena.

1. Realizar una dilución 1/100 de la muestra de ADN a cuantificar en agua libre de DNasa y RNasa.
2. Realizar lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm; usar como blanco de lectura agua libre de DNasa y RNasa.

La relación entre la lectura a 260 nm y a 280 nm (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>) da un estimado de pureza del ADN. Preparaciones puras de ADN tienen valores de 1.8.

Si existe contaminación con fenol o proteínas el valor de la relación OD<sub>260</sub>/280 es significativamente menor de 1.8, en estos casos, no es posible saber exactamente la concentración de ADN en la muestra. <sup>(40)</sup>

## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas A. K., Litchman A. H. y Pober J. S., *Inmunología celular y molecular*. 3ª Ed., Interamericana McGraw-Hill, Madrid, 1999, pp. 285-290.
2. Abraham L. J. y Kroeger K. M., Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease, *J. Leukocyte Biology*, 66:562-566, 1999.
3. Ackerman H., Usen S., Mott R., et al., Haplotypic analysis of the TNF locus by association efficiency and entropy, *Genome Biol.*, 4:R24, 2003.
4. Aggarwal B., Kohr W. J., Hass P. H., et al., Human tumor necrosis factor, *Journal Biol. Chem.*, 260:2345-2354, 1985.
5. Allen R. D., Polymorphism of the human TNF- $\alpha$  promoter random variation or functional diversity, *Molecular Immunology*, 39:1017-1027, 1999.
6. Aquino Gálvez Arnoldo, *Susceptibilidad genética del sistema HLA clase II en pacientes con tuberculosis pulmonar drogoresistente*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana, 2000.
7. Balladares S., Camacho A., Alaez C., et al., Distribución de los alelos de los nucleótidos dimórficos (SNP's) de once citocinas en mestizos mexicanos, *Memorias del XV Congreso Nacional de Inmunología*, Sociedad Mexicana de Inmunología, Ixtapa-Zihuatanejo, México, 2002.
8. Beck S. y Trowsdale J., The human major histocompatibility complex: lessons from the DNA sequence, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 1:117-137, 2000.
9. Beutler B. y Cerami A., Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin, *Nature*, 320:584-588, 1986.

- 10.** Beutler B. y Cerami A., The history, properties, and biological effects of cachectin, *Biochemistry*, 27:7575-7582, 1988.
- 11.** Beutler B. and Cerami A., The biology of cachectin/TNF a primary mediator of the host response, *Ann. Rev. Immunol.*, 7:625-55, 1989.
- 12.** Black R. A., Rauch C. T., Kozlosky C. J., et al., A metalloproteinase desintegrin that releases tumour-necrosis factor  $\alpha$  from cells, *Nature*, 385:729-732, 1997.
- 13.** Bois R. M. M., Interferon gamma-1 $\beta$  for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis, Internet: <http://www.nejm.org>, 1999.
- 14.** Brinkman B. M. N., Kaijzel E. L., Huizinga T. W. J., et al., Detection of a C-insertion polymorphism within the human tumor necrosis alpha (TNF $\alpha$ ) gene, *Hum. Genet.*, 96:493, 1995.
- 15.** Brody T. B., NF kappa B and programmed cell death, Internet: <http://sdb.bio.purdue.edu>, 1996.
- 16.** Brown H. T. y Beutler B., Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level, *J. Exp. Med.*, 171:465-475, 1990.
- 17.** Bucci M. K., What is tumor necrosis factor?, Internet: <http://cancer.med.upenn.edu>, 2000.
- 18.** Camacho Leal Ma. del Pilar, *Análisis de las respuestas a estrés durante la muerte celular inducida por el TNF- $\alpha$* . Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, 1999.
- 19.** Camarena A., Juárez A., Mejía M., et al., Major histocompatibility complex and tumor necrosis factor- $\alpha$  polymorphisms in pigeon breeder's disease, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 163:1528-1533, 2001.
- 20.** Chaturvedi M. M., LaPushin R. y Aggarwal B. B., Tumor necrosis factor and lymphotoxin, *J. of Biological Chemistry*, 269:14575-14583, 1994.

- 21.** Chen Ch., Sun Y., Chen J., et al., TNF- $\alpha$  induced cyclooxygenase-2 expression in human lung epithelial cells: involvement of the phospholipase C- $\gamma$ 2, protein kinase C- $\alpha$ , tyrosine kinase, NF- $\kappa$ B-inducing kinase, and I- $\kappa$ B kinase 1/2 pathway, *The Journal of Immunology*, 165:2719-2728, 2000
- 22.** Cherniack R. M., Crystal R. G. y Kalica A. R., Current concepts in idiopathic pulmonary fibrosis: a road map for the future, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 143:680-683, 1991.
- 23.** Coultas D. B., Zumwalt R. E., Black W. C., et al., The epidemiology of interstitial lung diseases, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 150:967-972, 1994.
- 24.** Decoster E., Cornelis S., Vanhaesebroeck B., et al., Autocrine tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin (LT)  $\alpha$  differentially modulate cellular sensitivity to TNF/LT- $\alpha$  cytotoxicity in L929 cells, *The Journal of Cell Biology*, 143:2057-2065, 1998.
- 25.** Ding A. H., Sánchez E., Srimal S., et al., Macrophages rapidly internalize their tumor necrosis factor receptors in response to bacterial lipopolysaccharide, *The Journal of Biological Chemistry*, 264:3924-3929, 1989.
- 26.** Dri P., Haas E., Cramer R., et al., Role of the 75-kDa TNF receptor in TNF-induced activation of neutrophil respiratory burst, *The Journal of Immunology*, 162:460-466, 1999.
- 27.** Dri P., Gasparini Ch., Menegazzi R., et al., TNF-induced shedding of the receptors in human polymorphonuclear leukocytes: role of the 55-kDa TNF receptor and involvement of a membrane bound and non-matrix metalloproteinase, *The Journal of Immunology*, 165:2165-2172, 2000.
- 28.** Durum S. K. y Muegge K., *Cytokine knockouts*, Ed. Human Press, New Jersey, pp.70, 71, 90, 96 y 97, 1998.
- 29.** Eliassen L. T., Rekdal Q., Svendsen J. S., et al., TNF 41-62 and TNF 78-96 have distinct effects on LPS-induced tissue factor activity and the production of cytokines in human blood cells, *Thromb. Haemost.*, 83:598-604, 2000.

- 30.** English K. B., Weaver W. M. y Wilson C. B., Differential regulation of lymphotoxin and tumor necrosis factor genes in human lymphocytes, *The Journal of Biological Chemistry* 266:7108-7113, 1991.
- 31.** Espevik T., Brockhaus M., Loetscher H., et al., Characterization of binding and biological effects of monoclonal antibodies against a human tumor necrosis factor receptor, *J. Exp. Med.*, 171:415-426, 1990.
- 32.** Estrada Bernal Adriana, *Efecto del TNF en la expresión de moléculas de adhesión en cultivos primarios de células endoteliales*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, 1998.
- 33.** Falfán Valencia Ramcés, *Polimorfismo y expresión del sistema HLA clase II y factor de necrosis tumoral - $\alpha$  en pacientes con neumonitis por hipersensibilidad*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana, 2000.
- 34.** Falfán V. R., Factor de necrosis tumoral: actividad biológica en neumopatías intersticiales, *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.*, 15:48-53, 2002.
- 35.** Franitza S., Hershkoviz R., Kam N., et al., TNF- $\alpha$  associated with extracellular matrix fibronectin provides a stop signal for chemotactically migrating T cells, *The Journal of Immunology*, 165:2738-2747, 2000.
- 36.** Fong C. W., Siddiqui A. H. y Mark D., Identification and characterization of a novel repressor site in the human tumor necrosis factor  $\alpha$  gene, *Nucleic Acids Research*, 22:1108-1114, 1994.
- 37.** Galvin J. R. y D'Alessandro M. P., Idiopathic pulmonary fibrosis, Internet: <http://www.vh.org>, 2000.
- 38.** Goh C. R. y Porter A. G., Structural and functional domains in human tumor necrosis factors, *Protein Engeneering*, 4:385-389, 1991.

- 39.** Goldfeld A. E., Doyle C. y Maniatis T., Human tumor necrosis factor  $\alpha$  gene regulation by virus and lipopolysaccharide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:9769-9773, 1990.
- 40.** Gorodezky C., *Manual de procedimientos de genética molecular*, Depto. de Inmunogenética del INDRE, México, 2000.
- 41.** Gruen J. R. y Weissman S. M., Evolving views of the major histocompatibility complex, *Blood*, 90:4252-4265, 1997.
- 42.** Guevara P. J. A., Marino M. W., Ivanov V. N., et al., Sex steroids induce apoptosis of CD8<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> double-positive thymocytes via TNF- $\alpha$ , *Eur. J. Immunol.*, 30:2586-2592, 2000.
- 43.** Hajeer A. H. y Hutchinson I. V., TNF-  $\alpha$  gene polymorphism: clinical and biological implications, *Microscopy Research and Technique*, 50:216-228, 2000.
- 44.** Han J., Huez G. y Beutler B., Interactive effects of the tumor necrosis factor promoter and 3' untranslated regions, *The Journal of Immunology*, 146:1843-1848, 1991.
- 45.** Hatzoglou A., Roussel J., Bourgeade M., et al., TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF- $\kappa$ B, Elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, *The Journal of Immunology*, 165:1322-1330, 2000.
- 46.** Higuchi M. y Aggarwal B. B., TNF induces internalization of the p60 receptor and shedding of the p80 receptor, *Journal of Immunology*, 152:3550-3558, 1994.
- 47.** Hou F. F., Boyce J., Zhang Y., et al., Phenotypic and functional characteristics of macrophage-like cells differentiated in pro-inflammatory cytokine-containing cultures, *Immunology and Cell Biology*, 78:205-213, 2000.
- 48.** Iáñez P. E., Curso de inmunología general 8. Complejo principal de histocompatibilidad, Internet: <http://www.uqr.es/~eianez/inmuno>, 2000.

- 49.** Ibarra Sánchez María, *Efecto de IL-2, INF- $\gamma$  y TNF en la inducción de citotoxicidad*, Tesis de Licenciatura, FES Zaragoza, UNAM, 1994.
- 50.** Ibarra Sánchez Ma. de J., *La ceramida como segundo mensajero del efecto citotóxico del TNF: posible participación de una proteínfosfatasa 2A activada por ceramida y sensible a ácido okádico*, Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, 1997.
- 51.** Idriss H. T. y Naismith J. H., TNF- $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s), *Microscopy Research and Technique*, 50:184-195, 2000.
- 52.** Jacob C. O., Tumor necrosis factor  $\alpha$  in autoimmunity: pretty girl or old witch? *Immunology Today*, 13: 122-125, 1992.
- 53.** Jindal S. K. y Gupta D., Incidence and recognition of interstitial pulmonary fibrosis in developing countries, *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 3:378-383, 1997.
- 54.** Jongeneel C. V., Briant L., Udalova I. A., et al., Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to extended HLA haplotypes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88:9717-9721, 1991.
- 55.** Ka-Ming C. F. y Lenardo M. J., A crucial role for p80 TNF-R2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes, *Eur. J. Immunol.*, 30:652-660, 2000.
- 56.** Kapanci Y., Desmouliere A., Pachane J., et al., Cytoskeletal protein modulation in pulmonary alveolar myofibroblasts during idiopathic pulmonary fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 152:2163-2169, 1995.
- 57.** Katzenstein A-L y Myers J., Idiopathic pulmonary fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 157:1301-1315, 1998.
- 58.** Kennedy R., Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), Internet: <http://www.medical-library.net>, 1999.

- 59.** Kroeger K. M. y Abraham L. J., Identification of an AP-2 element in the -323 to -285 region of the TNF- $\alpha$  gene, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 40:43-51, 1996.
- 60.** Kroeger K. M., Carville K. S. y Abraham L. J., The -308 tumor necrosis- $\alpha$  promoter polymorphism effects transcription, *Molecular Immunology*, 34:391-399, 1997.
- 61.** Kruys V., Thompson P. y Beutler B., Extinction of the tumor necrosis factor locus, and of genes encoding the lipopolysaccharide signaling pathway, *J. Exp. Med.*, 177:1383-1390, 1993.
- 62.** Kuprash D. V., Udalova I. A., Turetskaya R. L., et al., Similarities and differences between human and murine TNF promoters in their response to lipopolysaccharide, *The Journal of Immunology*, 162:4045-4052, 1999.
- 63.** Leung J. Y., McKenzie F. E., Ugliarolo A. M., et al., Identification of phylogenetic footprints in primate tumor necrosis factor- $\alpha$  promoters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:6614-6618, 2000.
- 64.** Li D. H., Havell E. A., Brown C. L. y Cullen J. M., Woodchick - $\alpha$ , - $\beta$  and tumor necrosis factor genes: structure, characterization and biological efectivity, *Gene*, 242:295-305, 2000.
- 65.** Liu H., Sidiropoulos P., Song G., et al., TNF- $\alpha$  gene expression in macrophages regulation by NF- $\kappa$ B is independent of c-Jun or C/EBP $\beta$ , *The Journal of Immunology*, 164:4277-4285, 2000.
- 66.** Louis E., Franchimont D., Piron A., Gevaert Y., et al., Tumor necrosis factor (TNF) gene polymorphism in influences TNF- $\alpha$  production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans, *Clin. Exp. Immunol.*, 113:401-406, 1998.
- 67.** Mackay F., Loetscher H., Stueber D., et al., Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55, *J. Exp. Med.*, 177:1277-1286, 1993.

- 68.** Mageto Y. N. y Raghu G., Genetic predisposition of idiopathic pulmonary fibrosis, *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 3:336-340, 1997.
- 69.** Magnusson C. y Vaux D., Signalling by CD95 and TNF receptors: not only life and death, *Immunology and Cell Biology*, 77:41-46, 1999.
- 70.** Márquez Velasco Ricardo, *Concentraciones séricas del TNF en pacientes con sépsis. Efecto sobre el catabolismo protéico*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, 1994.
- 71.** Maskos K., Fernández-Catalan C., Huber R., et al., Cristal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:3408-3412, 1998.
- 72.** Mason R. J., Schwarz M. I., Hunninghake G. W., et al., Pharmacological therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. Past, present, and future, Internet: <http://www.mdspeakcom/dators/specialreports>, 1999.
- 73.** McGeehan G. M., Becherer J. D., Bast R. C., et al., Regulation of tumour necrosis factor- $\alpha$  processing by a metallopropeinase inhibitor, *Nature*, 370:558-561, 1994.
- 74.** Miyazaki Y., Araki K., Vesin C., et al., Expression of a tumor necrosis factor - $\alpha$  transgene in murine lung causes lymphocytic and fibrosing alveolitis, *J. Clin. Invest.*, 96:250-259, 1995.
- 75.** Moss M. L., Jin S-L. C. y Milla M. E., Cloning of a desintegrin metalloproteinase that processes precursor tumor necrosis factor - $\alpha$ , *Nature*, 385:733-736, 1997.
- 76.** Nash J. R. G., McLaughlin P. J., Butcher D., et al., Expression of tumour necrosis factor- $\alpha$  in cryptogenic fibrosing alveolitis, *Histopathology*, 22:343-347, 1993.
- 77.** National Jewish Medical and Research Center, Interstitial lung disease, Internet: <http://www.nationaljewish.org>, 2000.

- 78.** NHI Publications, What is idiopathic pulmonary fibrosis?, Internet: <http://noairtogo.tripod.com>, 1995.
- 79.** Nicola N. A., *Guidebook to cytokines and their receptors*, Ed. Sambrook and Tooze Publication, New York, pp. 103-110, 1994.
- 80.** Old Lloyd J., Tumor necrosis factor, *Scientific American*, 5:59-75, 1988.
- 81.** Orosz P., Echtenacher B., Falk W., et al., Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor, *J. Exp. Med.*, 177:1391-1398, 1993.
- 82.** Pantelidis P., Fanning G. C., Wells A. U., et al., Analysis of tumor necrosis factor- $\alpha$ , lymphotoxin- $\alpha$ , tumor necrosis factor receptor II, and interleukin-6 polymorphisms in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 163:1432-1436, 2001.
- 83.** Pauli U., Control of tumor necrosis factor gene expression, *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 4:323-344, 1994.
- 84.** Pennica D., Nedwin G. E., Hayflick J. S., Human tumor necrosis factor precursor structure, expression and homology to lymphotoxin, *Nature*, 312:724-729, 1984.
- 85.** Perez C., Albert I., DeFay K., et al., A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact, *Cell*, 63:251-258, 1990.
- 86.** Pociot F., D'Alfonso S., Compasso S., Scorza R., et al., Functional analysis of a new polymorphism in the human TNF  $\alpha$  gene promoter, *Scand. J. Immunology*, 42:501-504, 1995.
- 87.** Rhoades K. L., Golub S. H. y Economou J. S., The regulation of the human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter region in macrophage, T cell, and B cell lines, *The Journal of Biological Chemistry*, 267:22102-22107, 1992.
- 88.** Rosendahl M. S., Ko C., Long M., et al., Identification and characterization of a pro-tumor necrosis  $\alpha$ - processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases, *Journal of Biological Chemistry*, 272:24588-24593, 1997.

- 89.** Ruddle N. H., Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and lymphotoxin (TNF- $\beta$ ), *Current Opinion in Immunology*, 4:327-332, 1992.
- 90.** Ryu J. H., Colby T. V. y Hartman T. E., Idiopathic pulmonary fibrosis: current concepts, *Mayo Clin Proc.*, 73:1085-1101, 1998.
- 91.** Saleh D., Furukawa K., Tsao M., et al., Elevated expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in idiopathic pulmonary fibrosis: possible involvement of proinflammatory cytokines, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 16:187-193, 1997.
- 92.** Santees S. M. y Owen-Schaub L. B., Human tumor necrosis factor p75/80 (CD 120b) gene structure and promoter characterization, *The Journal of Biological Chemistry*, 271:21151-21159, 1996.
- 93.** Sarmiento M. J. y Guerrero C. A., Cuantificación del factor de necrosis tumoral en tejido pulpar y lesiones periapicales, Internet: <http://www.encolombia.com>, 1994.
- 94.** Schall T., Lewis M., Koller K. J., et al., Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor, *Cell*, 61:361-370, 1990.
- 95.** Schwartz D. A., Helmers R. A., Galvin J. R., et al., Determinants of survival in idiopathic pulmonary fibrosis, *Am J. Respir. Crit. Care Med.*, 149:450-454, 1994.
- 96.** Scope, Fibrosis pulmonar idiopática, Internet: [www.drscope.com/pcc/mq/a4/mqa4\\_p52.htm](http://www.drscope.com/pcc/mq/a4/mqa4_p52.htm), 2000.
- 97.** Scuderi P., Supresion of human leukocyte tumor necrosis factor secretion by the serine protease inhibitor p-toluenesulfonyl-L-arginine methyl ester (TAME), *The Journal of Immunology*, 143:168-173, 1989.
- 98.** Selman L. M., *Neumopatías intersticiales difusas*, Editorial Médica panamericana, 1er. Edición, pp. 89-103, 1996.

- 99.** Selman L. M., Clasificación actual de las neumopatías intersticiales idiopáticas., *Arch. Bronconeumol.*, 36:543-544, 2000.
- 100.** Skoog T., Van't Hof F. M., Kallin B., et al., A common functional polymorphisms (C→A substitution at position -863) in the promoter region of the tumour necrosis- $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) gene associated with reduced circulating levels of TNF  $\alpha$ , *Human Molecular Genetics*, 8:1443-1449, 1999.
- 101.** Smyth M. J. y Johnstone R. W., Role of TNF in lymphocyte-mediated cytotoxicity, *Microscopy Research and Technique*, 50:196-208, 2000.
- 102.** Smith R. A. y Baglioni C., The activate form of tumor necrosis factor is a trimer, *The Journal of Biological Chemistry*, 262:6951-6954, 1987.
- 103.** Takashiba S., Shapira L., Amar S., et al., Cloning and characterization of human TNF $\alpha$  promoter region, *Gene*, 131:307-308, 1993.
- 104.** Targalia L. A. y Goeddel D. V., Two TNF receptor, *Immunology Today*, 13:151-153, 1992.
- 105.** Thoma B., Grell M., Pfizenmaier K, et al., Identification of a 60-Kd tumor necrosis factor (TNF) receptors as the major signal transducing component in TNF responses, *J. Exp. Med.*, 172:1019-1023, 1990.
- 106.** Thomson A. W., *The cytokine handbook*, 2ª Ed., Ed. Academic Press, Londres, pp. 289-300, 1994.
- 107.** Van Ostade X., Tavernier J., y Fiers W., Two conserved tryptophan residues of tumor necrosis factor and limphotoxin are not involved in the biological activity, *FEB*, 238:347-352, 1988.
- 108.** Van Ostade X., Tavernier J. y Fiers W., Structure-activity studies of human tumour necrosis factors, *Protein Engineering*, 7:5-22, 1994.

- 109.** Vassalli Pierre, The pathophysiology of tumor necrosis factors, *Annu. Rev. Immunol.*, 10:411-452, 1992.
- 110.** Vilcek J. y Lee T. H., Tumor necrosis factor, *The Journal of Biological Chemistry*, 266:7313-7316, 1991.
- 111.** Wallach D., Varfolomeev E. E., Malinin N. L., et al., Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms, *Annu. Rev. Immunol.*, 17:331-367, 1999.
- 112.** Watanabe N., Kuriyama H., Sone H., et al., Continuous internalization of tumor necrosis factor receptors in a human myosarcoma cell line, *The Journal of Biological Chemistry*, 263:10262-10266, 1988.
- 113.** Wilborn J., Bailie M., Coffey M., et al., Constitutive activation of 5-lipoxygenase in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *J. Clin. Invest.*, 97:1827-1836, 1996.
- 114.** Wilson A. G., Di Giovine F. S., Blakemore A. I. F., et al., Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) gene detectable by Nco I restriction of PCR product, *Hum. Mol. Genetics.*, 1:353, 1992.
- 115.** Wilson A. G., Symons J. A., McDowell T. L., et al., Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter on transcriptional activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94:3195-3199, 1997.
- 116.** Wilson A. G., Vries N., Pociot F., di Giovine F. S., et al., An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter regions is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles, *J. Exp. Med.*, 177: 557-560, 1993.
- 117.** Wunsch H., New treatment proposed for idiopathic pulmonary fibrosis, Internet: <http://www.findarticles.com>, 1999.
- 118.** Zhang Y., Lee T. C., Guillemin B., et al., Enhanced IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestosis exposure, *The Journal Immunology*, 150:4188-4196, 1993.

**119. Zhang X. y Morrison D. C., Lipopolysaccharide-induced selective priming effects on tumor necrosis factor  $\alpha$  and nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages, *J. Exp. Med.*, 177:511-516, 1993.**