



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Polimorfismo NA2 para el Receptor Fc γ RIIIb
en Muestras de Biopsia Pulmonar de
Pacientes con Neumonitis por
Hipersensibilidad

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGO

PRESENTA

CESAR ZAVALA BARRERA

Director: Q.F.B. Mariana Téllez Araiza

Asesor: Dr. Edelmiro Santiago Osorio



Febrero, 2012



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.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de alguna manera colaboraron a la creación de este trabajo que me permito cumplir otra etapa en mi formación académica.

Al Dr. Erasmo Martínez Cordero por abrirme las puertas de su laboratorio, por su apoyo y facilidades otorgadas.

A mi directora de tesis, Mariana Téllez Araiza que ordenó mis ideas cuando estaban en un mar de confusión, que fue mi guía en la construcción de esta tesis.

A mi asesor interno de la facultad, Dr. Edelmiro Santiago Osorio por su apoyo en la revisión y corrección de esta tesis.

A mis revisores, Dra. Elia Roldán, Dra. Ma. De Lourdes Mora, M. en C. Edgar Ledesma por el apoyo y tiempo que me brindaron para la finalización de esta tesis.

A mis padres, Ruperto Zavala Chávez y Renata Barrera Pacheco por el apoyo que me brindaron, por la formación, por fomentar en mí el deseo de superación.

A mis hermanos, José Alberto y Marisol que siempre estuvieron, están y seguirán estando, brindándome cariño y soporte.

A mis amigos y hermanos universitarios con quienes compartí mañanas, tardes y noches, momentos de angustia en parciales y finales; practicas de campo, noches de fiesta que terminaban en platicas muy intensas.

A todas las personas que me apoyaron

GRACIAS!!!

INDICE

Resumen	1
1. Introducción	2
2. Marco teórico	4
2.1. Acido desoxirribonucleico (ADN)	4
2.2. Replicación	5
2.3. Transcripción	5
2.4. Traducción	5
3. Receptores para la porción Fc (FcR)	6
3.1. Tipos de receptores fc	7
3.2. Receptores para la porción Fc de IgG (FcγR)	7
3.3. Familia de genes FcγR	8
3.4. FcγRIII (CD16)	9
3.5. FcγRIIIB	10
3.6. Frecuencia del polimorfismo NA1, NA2	11
3.7. Deficiencia del receptor FcγRIIIB	11
3.8. Receptores Fc en enfermedades autoinmunes	12
4. Neumonitis por hipersensibilidad (NH)	13
4.1. Agentes causales	13
4.2. Epidemiología	14
4.3. Patogenia y Respuesta Inmunológica	14

5. Planteamiento del problema	18
6. Hipótesis	19
7. Objetivos	19
7.1. Objetivo general	19
7.2. Objetivos secundarios	19
8. Método	20
8.1. Tipo de estudio	20
8.2. Grupos de estudio	20
8.3. Criterios de exclusión	20
8.4. Criterios de inclusión	21
8.5. Extracción de ácidos nucleicos	21
8.5.1. Extracción de ARN	21
8.5.2. Extracción de ADN	21
8.5.3. Obtención de células blancas de sangre periférica	22
8.6. Integridad y Pureza	23
8.7. RT-PCR	23
8.8. PCR	23
8.9. Análisis estadístico	24
9. Resultados	25
10. Análisis de resultados y discusión	33
11. Conclusiones	35

12. Anexo 1	36
12.1. PCR	36
12.2. Electroforesis	37
12.3. Equilibrio Hardy-Weinberg	38
12.4. Calculo de frecuencia alélica a partir de frecuencias genotípicas	40
13. Anexo 2	42
13.1. Soluciones	42
14. Glosario	43
15. Bibliografía	48

Resumen

La Neumonitis por Hipersensibilidad es un síndrome complejo en términos etiológicos y fisiopatológicos causado por una respuesta inmune exagerada. En México la Neumonitis por hipersensibilidad se debe principalmente a antígenos de paloma (Antígeno aviario) lo que ocasiona alteraciones en la respuesta inmune a través de los receptores FcγRIIIB, a algunos polimorfismos se les relaciona con diversas enfermedades autoinmunes, se desconoce si estos participan en el desarrollo de la Neumonitis por Hipersensibilidad.

Para el estudio se amplificó la secuencia correspondiente de ácido desoxirribonucleico para NA2 por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cualitativa, empleando muestras de donadores sanos sin relación con la enfermedad estudiada, muestras de contactos asintomáticos y pacientes con neumonitis por hipersensibilidad del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) para determinar si el polimorfismo NA2 del receptor FcγRIIIB influye en la susceptibilidad o resistencia a la neumonitis por hipersensibilidad.

Se trabajó con tres grupos de estudio. a) Pacientes con neumonitis por hipersensibilidad b) Contactos asintomáticos y c) un grupo de controles sanos sin historia de contacto con aves, se observó que el polimorfismo NA2 no se presenta de manera similar en los tres grupos ya que se muestra una mayor frecuencia alélica en el grupo de asintomáticos con respecto a pacientes con Neumonitis siendo ésta de 45% y 7.5% respectivamente, mientras que en los sanos sin contacto fue de 30%. Se observan resultados iguales tanto en muestras de ADN como de ARN ya que la distribución alélica fue exactamente la misma para ambas muestras. La mayoría de pacientes con Neumonitis presentan el alelo silvestre NA1 y los asintomáticos el alelo polimórfico NA2 razón por la cual consideramos que éste polimorfismo está implicado en algún tipo de protección, desde luego mucho más complejo que solo la presencia y expresión de este gen, evitando que este grupo de estudio desarrollara la enfermedad.

1. INTRODUCCION

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es el portador de la información genética en cada individuo, explica características fenotípicas y genotípicas como la expresión de las proteínas, tanto en términos estructurales como de función. Cuando se producen alteraciones en la secuencia del ADN (mutaciones ó polimorfismos) las proteínas traducidas pueden tener alteraciones que las hace más eficientes, deficientes o no funcionales, sin embargo pueden existir cambios que no alteren de manera importante la actividad de las proteínas. Las alteraciones del ADN son estudiadas por disciplinas como la biología molecular, que se centra en el estudio de los ácidos nucleicos utilizando técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus diferentes variables, cuya finalidad es el establecimiento de técnicas de análisis que permitan realizar el diagnóstico de enfermedades cuyo origen puede ser a nivel molecular.

La inhalación y exposición sostenida de partículas orgánicas e inorgánicas, puede condicionar en algunas personas susceptibles a enfermedades de las vías aéreas y del parénquima pulmonar. Cuando estas son de origen orgánico, el trastorno se conoce con el nombre de Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) ó alveolitis alérgica extrínseca. Esta enfermedad se caracteriza fundamentalmente por inflamación intersticial de predominio mononuclear en su fase crónica y que, dependiendo de muchos factores, la mayoría desconocidos, puede, en un porcentaje importante de los casos, desencadenar la fibrosis pulmonar con la consecuente invalidez física y muerte a mediano plazo.

La NH es un síndrome complejo causado por una respuesta inmune exagerada, afecta a menos del 7% de la población. En México, la NH habitualmente es inducida por palomas (Neumonitis por hipersensibilidad a antígeno aviario) y se ha reportado que afecta primordialmente a mujeres (Mejía *et al.*, 2007). Los antígenos más frecuentes que causan neumonitis por hipersensibilidad en todo el mundo, son las proteínas de ave y la bacteria *Saccharopolyspora rectivirgula* (Selman *et al.*, 2010).

Estudios han identificado el polimorfismo NA2 como un factor de susceptibilidad en enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple. Las formas alélicas NA1/NA2 son pertenecientes al grupo de receptores Fc γ , este tipo de receptores pertenecen a la súper familia de las inmunoglobulinas, se dividen en Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16), tienen diverso grado de polimorfismo los cuales se expresan en diferentes tipos celulares por lo que presentan distinta afinidad a la IgG monomérica. Los Fc γ RIII están formados por 2 genes (IIIA y B), los cuales producen los transcritos correspondientes IIIa y IIIb; Fc γ RIIIB presenta un polimorfismo denominado NA (antígeno neutrofílico), el cual tiene dos tipos alélicos comunes denominadas NA1 y NA2. Ambos alelos participan en la fagocitosis de partículas opsonizadas por IgG1 e IgG3.

Debido a que el Fc γ RIIIB tiene gran importancia en distintos mecanismos relacionados con la fagocitosis, y en la eliminación de complejos inmunes (CI) grupos de investigadores han estudiado sí los polimorfismos de este receptor se pueden asociar con el desarrollo de enfermedades que involucran una respuesta inmune alterada, en particular los procesos patológicos mediados por CI, como la glomerulonefritis secundaria a lupus eritematoso ó nefropatía por IgA, se propone explorar los polimorfismos de este receptor en la NH, que característicamente presenta una sobre activación de células B con diferentes trastornos humorales incluyendo la formación de complejos inmunes circulantes (CIC).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Acido Desoxirribonucleico (ADN)

El ADN es una estructura formada por dos cadenas de polinucleótidos (nucleótidos de 4 tipos formados por un componente ácido: fosfato, componente neutro: azúcar desoxirribosa y un básico: bases nitrogenadas pirimidínicas y púricas) (Dhanda, 2008) que están orientadas en direcciones opuestas (anti paralelas) y giran alrededor de un eje común formando una doble hélice dextrógira, las bases púricas y pirimidínicas están ubicadas en el interior de la hélice, mientras que las unidades de fosfato y de desoxirribosa lo están en el exterior (Watson y Crick, 1953). La Adenina se une a la Timina mediante dos puentes de Hidrógeno y la Guanina con la Citosina mediante tres puentes de Hidrógeno. Los tipos de hélice del DNA son: A, B y Z. La hélice B fue la propuesta por Watson y Crick en 1953.

El ADN es el portador de la información genética. El término “Dogma central de la biología molecular” (fig. 1) que introdujo Francis Crick en 1970 describe el flujo de la información genética; es decir la transmisión de la información contenida en el ADN a las células y organismos descendientes mediante la replicación y su expresión en biomoléculas funcionales mediante los procesos de transcripción y traducción.

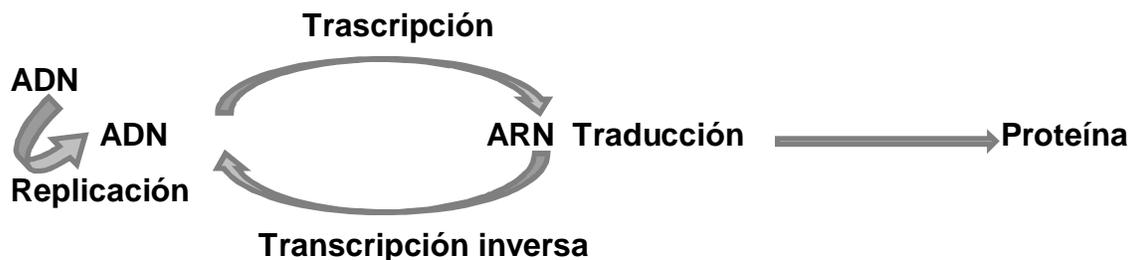


Figura 1. Dogma central de la biología molecular, Tomado y modificado de Luque, 2001.

2.2. Replicación del ADN

Consiste en la formación de dos cadenas de ADN a partir de una, siguiendo como modelo de copia las dos hebras de la molécula progenitora. Es semiconservativa cada cadena tiene una hebra del ADN madre y una de nueva síntesis, esto permite el paso de la información genética a la descendencia. La replicación es ordenada y secuencial, empieza en puntos concretos denominados orígenes de la replicación y transcurre en forma bidireccional: la hebra conductora se sintetiza en continuo y la hebra retardada se sintetiza en fragmentos (fragmentos de Okazaki), esto es lo que hace a la replicación semidiscontinua; ambas hebras se sintetizan en dirección 5' ->3' (Alcano, 1999; Luque, 2001).

2.3. Transcripción

Es la síntesis de una molécula de ARN a partir de la información genética contenida en la región codificante de un ADN. El ARN tiene una composición de bases ligeramente distinta que el ADN, lleva Uracilo en lugar de Timina, por lo tanto, en los apareamientos se colocara el Uracilo en el lugar de timina. El proceso es catalizado por una ARN polimerasa dependiente de ADN o transcriptasa. El sentido de la transcripción es en dirección 5' -> 3' El ARN sintetizado es un ARNhn que posteriormente dará origen a un ARNm que es el que lleva el mensaje (secuencia) de los aminoácidos para la proteína codificada (Alcano, 1999; Luque, 2001).

2.4. Traducción

Consiste en la síntesis de las proteínas mediante la unión de aminoácidos según el orden establecido por la secuencia de nucleótidos del ARNm y el

código genético. Intervienen una gran cantidad de moléculas entre las más importantes están:

- ARN de transferencia (ARNt) portadores de aminoácidos en forma de aminoacil.
- Ribosomas formados por ARNt y proteínas
- Un ARNm de secuencia distinta para cada polipéptido sintetizado
- Factores proteicos de inicio, elongación y terminación de la síntesis.

Las proteínas sintetizadas pueden tener alteraciones que las hace más eficientes, deficientes o no funcionales estas alteraciones pueden deberse a variaciones en la secuencia del ADN (Polimorfismos) existe una variación de un solo par de bases al cual se le denomina polimorfismo de nucleótido simple (SNP) (Alcano, 1999; Luque, 2001; Alberts, 2002). Estas alteraciones las podemos estudiar haciendo uso de técnicas de biología molecular como la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Existen enfermedades en las que ciertos receptores celulares participan en procesos inflamatorios, un cambio en éstos receptores puede derivar en daño tisular. Uno de estos receptores es el FcγRIIIB, del que se sabe existe un polimorfismo genético denominado NA2, el cual consiste en el cambio de cuatro aminoácidos en la proteína (De Haas *et al.*, 1995., Brambila-Tapia y Dávalos-Rodríguez, 2009,).

3. RECEPTORES PARA LA PORCIÓN Fc (FcR).

Los receptores Fc forman parte del extenso grupo de receptores de membrana que pertenecen a la súper familia de las inmunoglobulinas. Se encuentran en varios tipos celulares como células NK, neutrófilos, macrófagos y mastocitos. Su nombre se debe a que su ligando es la parte inferior (Fragmento Fc) de las

inmunoglobulinas. Su activación estimula la citotoxicidad mediada por células, la fagocitosis, la activación de mastocitos, la destrucción de microbios y células infectadas (Davis *et al.*, 2001).

3.1. Tipos de receptores Fc

Existen varias clases de receptores para la parte Fc de los anticuerpos, dependiendo del tipo de inmunoglobulina que reconocen. Los receptores que unen IgG se conocen como receptores Fc gamma (Fc γ R). Los receptores para IgA se conocen como receptores Fc alfa (Fc α R) y los receptores para IgE se conocen como receptores Fc épsilon (Fc ϵ R) (Mora y Rosales, 2009).

3.2. Receptores para la Porción Fc de IgG (Fc γ R).

Todas las células del sistema inmune expresan receptores para la fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas G (IgG) conocidos como Fc γ R, los cuales son miembros de la súper familia de las inmunoglobulinas (Abbas *et al.*, 2001). El trabajo normal de las células inmunológicas, es esencial para la defensa del organismo frente a agentes extraños. En los seres humanos se comunican con el exterior a través de receptores de superficie. Utilizan receptores del tipo Fc para unirse a las inmunoglobulinas dando un paso crucial en la opsonización y fagocitosis. Cualquier cambio estructural debido a una variación genética en los receptores Fc puede alterar la habilidad de estas células para responder a complejos inmunes y eliminar la infección. Determinados polimorfismos en los receptores Fc expresados en la superficie de las células fagocíticas muestran un papel relevante en la susceptibilidad a infecciones. Los genes del receptor de superficie Fc gamma se alojan en el cromosoma 1 y codifican tres clases de receptor: El Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16). Dichos receptores fueron descubiertos hace treinta y

cinco años cuando se observó que las inmunoglobulinas IgG eran citofílicas para macrófagos en presencia de glóbulos rojos opsonizados (Abbas *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2005; Rodrigo-Gómez *et al.*, 2008).

Los receptores Fc son una familia heterogénea de glicoproteínas de membrana que unen la fracción Fc de la inmunoglobulina G (IgG). Poseen una función importante en el sistema inmune ya que proporcionan la conexión entre inmunidad humoral y celular. La unión de estos receptores con su ligando, como la IgG, produce cambios conformacionales y por lo tanto activación de funciones efectoras como citotoxicidad dependiente de anticuerpos, ingesta de complejos inmunes y liberación de citocinas pro-inflamatorias. El Fc γ RI posee alta afinidad por la IgG en forma monomérica, mientras que Fc γ RII y Fc γ RIII, son de baja afinidad y sólo unen la IgG en forma de complejos inmunes. Los receptores Fc son clasificados por su afinidad a IgG. Por lo tanto existen los receptores de alta afinidad y de baja afinidad (Tabla 1) (Gómez *et al.*, 2005).

Después del reconocimiento del anticuerpo los receptores Fc son agregados en la membrana de la célula iniciando con esta agregación las vías de señalamiento que llevan a la activación celular. La activación de los fagocitos es la función más común que se atribuye a los receptores Fc. Los neutrófilos y los macrófagos comienzan a ingerir y destruir a los agentes patógenos recubiertos de IgG a través del proceso de fagocitosis. Otro proceso que involucra a los receptores Fc es la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (Mora y Rosales, 2009).

3.3. Familia de genes Fc γ R

Se reconocen tres clases principales de Fc γ R codificados por ocho genes en el brazo "q" del cromosoma 1 (1q21-24) (Brambila-Tapia y Dávalos-Rodríguez; 2009; Gómez *et al.*, 2005; Stroncek, 2004) (Fig. 2). Estos se ubican en una zona de 10kb (Gómez *et al.*, 2005).

3.4. FcγRIII (CD16)

Es un receptor de baja afinidad, de 50-70 kDa que interactúa principalmente con IgG multivalente, contiene dos miembros, cada uno de los cuales es codificado por genes diferentes pero altamente homólogos (FcγRIIIA y FcγRIIIB). Estos receptores son expresados en tipos celulares específicos (Abbas *et al.*, 2001).

Clasificación de Receptores Fcγ

Nombre	CD	Afinidad	Expresión Celular	PM (Kda)	Polimorfismo Genético
FcγRI	64	Alta	Mo,DC,Eo,Ne	72	Conservado
FcγRIIA	32	Baja	Mo,DC,Eo,Ne,PI	40	H131R
FcγRIIB	32	Baja	LB,Mastocito,Bas,Mo,Eo,Ne,DC	40	I232T
FcγRIIIA	16	Baja	Mo,NK,Mastocito,Eo,DC	50-80	F158V
FcγRIIIB	16	Baja	Ne,Eo	50-80	NA1-NA2

Abreviaciones. Mo: monocitos/macrófagos; DC: células dendríticas; Eo: eosinófilos; Ne: neutrófilo; Ba: basófilo; LB: linfocito B; NK: célula asesina natural, Ma: mastocito; PI: plaquetas; PM: peso molecular; CD: *cluster differentiation*; H: histidina; R: arginina; I: isoleucina; T: treonina; F: fenilalanina; V: valina; NA1: antígeno neutrofílico 1; NA2: antígeno neutrofílico 2.

Tabla 1. Tomada y modificada de Gómez *et al.*, 2005.

3.5. FcγRIIIB

El gen de la isoforma FcγRIIIB está localizado en el brazo “q” del cromosoma (1 q22). El FcγRIIIB es el receptor que se expresa mas ampliamente en neutrófilos y por lo tanto en todo el sistema inmunológico; el número promedio de copias de esta molécula en la membrana celular es de 190 000, con un rango entre 100 000 - 400 000. (De Haas *et al.*, 1995; López *et al.*, 2003). Este receptor en lugar de tener una proteína transmembranal como otros receptores Fcγ esta anclado a la membrana por un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI) y participa en la fagocitosis y en la activación de los neutrófilos (Brambila-Tapia y Dávalos-Rodríguez, 2009). Este receptor es una glicoproteína constituida por 233 aminoácidos, es altamente homologo al FcγRIIIA, una diferencia importante entre estos dos receptores es que FcγRIIIA difiere de FcγRIIIB en cinco nucleótidos de la región codificante del gen lo que resulta en un cambio en la secuencia de aminoácidos.

El polimorfismo del FcγRIIIB tiene dos formas alélicas comunes denominadas NA1 y NA2 (Nimmerjahn y Ravetch. 2005), El alelo NA1 participa en la fagocitosis de partículas opsonizadas por IgG1 e IgG3, interacciona con mayor eficiencia con complejos inmunes (CI) constituidos por IgG3, menos que el alelo NA2 y se ha sugerido que los individuos NA1 tienen mayor capacidad fagocítica que los portadores del alelo NA2 (Salmon *et al.*, 1995; Stroncek, 2004; Takai, 2005), se ha visto involucrado en lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, neutropenias autoinmunes y aloinmunes (Brambila-Tapia y Dávalos-Rodríguez, 2009,).

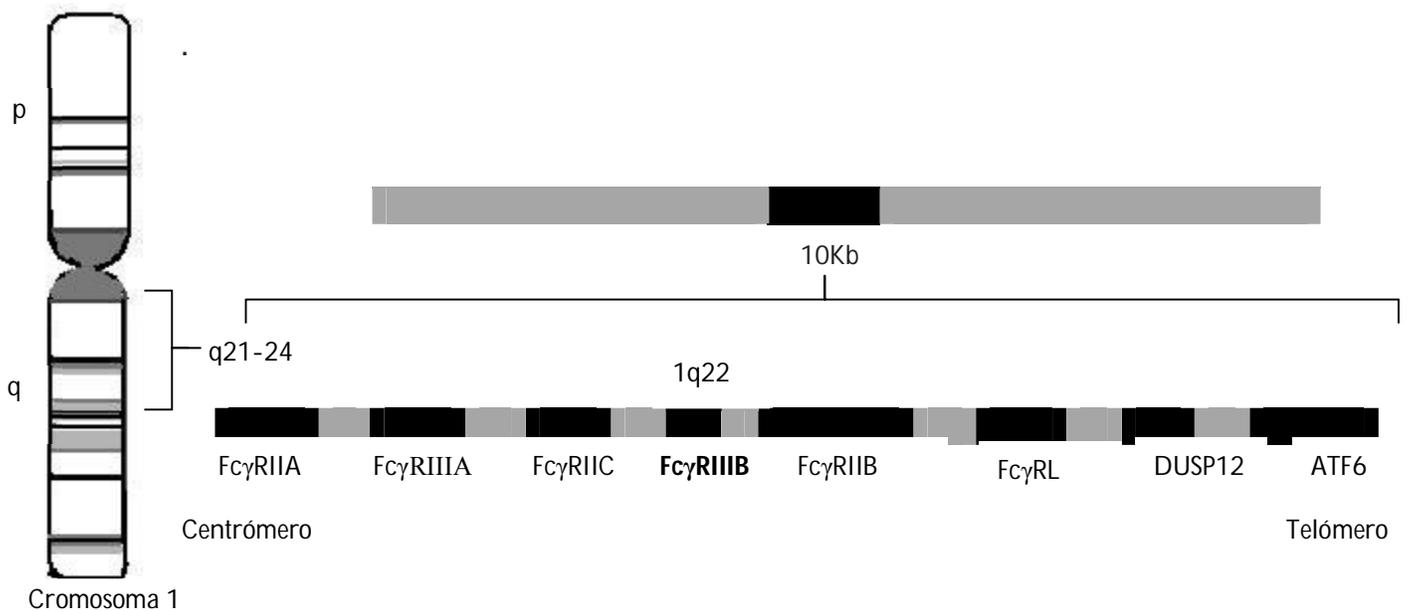


Figura 2. Localización de los genes FcγR en el cromosoma 1 (1q21-24), FcγRIIIB en 1q22. Tomado y modificado de Brambila-Tapia y Dávalos-Rodríguez; 2009; Gómez *et al.*, 2005.

3.6. Frecuencia del polimorfismo NA1, NA2

La frecuencia de este polimorfismo varía dependiendo del grupo racial; la frecuencia del alelo NA1 en la población caucásica oscila entre el 0.30% y el 0.37%, la frecuencia del alelo NA2 se encuentra entre el 0.63% y 0.70%. En comparación con las poblaciones china y japonesa, la frecuencia de los alelos NA1 y NA2 son de 0.60% al 0.66% para NA1 y 0.30% al 0.33% para NA2 (Juergen, 1997; Stroncek, 2004).

3.7. Deficiencia del receptor FcγRIIIB

Aproximadamente el 0,1% de la población europea no expresa la FcγRIIIB en sus neutrófilos, y como consecuencia no presentan los receptores NA1 y NA2.

Este fenotipo se llama NA-nulo y es causada por una deficiencia genética del Fc γ RIIIb (Fromont, 1992). Sin embargo el único padecimiento concretamente relacionado con la ausencia del receptor Fc γ RIIIB es la neutropenia isoinmune neonatal (INN) (De Haas *et al.*, 1995).

3.8. Receptores Fc en enfermedades autoinmunes

Las enfermedades autoinmunes, conjugan factores ambientales, genéticos, inmunológicos y hormonales. Se caracterizan por la presencia de una respuesta linfocitaria T y/o B, acompañados de inflamación, producción de autoanticuerpos, presencia de autoantígenos, pérdida de la tolerancia y daño tisular (Sánchez-Rodríguez, 2004).

El estudio de los receptores Fc en el contexto de autoinmunidad ha despertado un gran interés por su implicación biológica en la depuración de complejos inmunes. Además, estudios recientes han demostrado que algunos polimorfismos de estos receptores también pueden afectar la respuesta a diversos medicamentos biológicos como los anticuerpos monoclonales (Van der Pol, 1998). Se han realizado estudios con respecto a algunas enfermedades autoinmunes relacionadas con el receptor Fc γ RIII y su polimorfismo alélico en donde un estudio en Taiwán encontró que el genotipo NA1/NA1 protegía contra lupus eritematoso sistémico (LES) ($p = 0.028$), pero confería susceptibilidad para lupus discoideo ($p < 0.005$) (Chen *et al.*, 2004). En otro estudio en Japón se encontró una asociación significativa entre el genotipo Fc γ RIIIB-NA2/NA2 y la susceptibilidad a padecer LES ($p = 0.008$). Los individuos con el genotipo NA2/NA2 fueron más propensos de padecer nefritis lúpica ($p = 0.007$) (Hatta *et al.*, 1999). En pacientes tailandeses también se encontró asociación entre el genotipo NA2/NA2 y la presencia de LES (Siriboonrit *et al.*, 2003).

Los polimorfismos de los receptores Fcγ influyen en la eficacia de la respuesta celular y han sido asociados con enfermedades inflamatorias, infecciosas y autoinmunes.

4. NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD (NH).

La Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) fue nombrada por primera vez en 1713 por Ramazzini, en su tratado de enfermedades profesionales, aunque el trabajo que describe con mayor precisión lo que hoy se conoce como NH se debe al inglés Campbell, publicado en 1932 (Hinojosa, 2000).

4.1. Agentes causales

La neumonitis por hipersensibilidad o alveolitis alérgica extrínseca puede definirse como una enfermedad pulmonar de base inmunológica producida por una amplia gama de antígenos que llegan al pulmón por vía aeróbica, vehiculizados por polvos orgánicos e inorgánicos de procedencias muy diversas. Las formas más conocidas son el pulmón del granjero y el pulmón del cuidador de aves (Cebollero, 2005). Diferentes microorganismos como hongos, actinomicetos, amebas, proteínas de procedencia animal y vegetal, también productos de bajo peso molecular se han descrito como capaces de producir esta enfermedad cuyas manifestaciones clínicas son muy similares, con independencia del agente específico que la origina. Por el contrario, es la frecuencia e intensidad de exposición al polvo responsable y el grado de respuesta inmunológica del paciente lo que determina que los individuos sensibilizados sufran la enfermedad (Hinojosa, 2000; Mejia *et al.*, 2007). Sin embargo, los antígenos más frecuentes que causan neumonitis por hipersensibilidad en todo el mundo, son las proteínas de aves (mucina intestinal) (Cebollero, 2005) y la bacteria *Saccharopolyspora rectivirgula*

(glicoproteínas con residuos manosa, glucosa y galactosa) (Selman *et al.*, 2010).

4.2. Epidemiología

La prevalencia e incidencia de la neumonitis por hipersensibilidad es baja. Además los datos varían en función de la presencia de ciertas industrias en las cercanías y los factores de riesgo del huésped. Sólo unos pocos individuos de toda la población expuesta desarrollan la enfermedad y en ello influyen factores genéticos, ambientales y las características del propio antígeno.

Se ha calculado que afecta a 7% de las personas expuestas a los antígenos causales. En México, la Neumonitis por Hipersensibilidad frecuentemente es inducida por palomas y afecta principalmente a mujeres (Mejía *et al.*, 2007).

En la Ciudad de México, las delegaciones Iztacalco, Venustiano Carranza, Cuauhtémoc, Iztapalapa e incluso las zonas conurbadas del Estado de México están asociados a la Neumonitis por Hipersensibilidad, las causas de esta asociación no parece ser geográfica, pero existe el antecedente de que esa zona anteriormente fue designada para almacenar la basura de la ciudad, por lo que partículas orgánicas en el ambiente pudieran coadyuvar a la aparición de esta enfermedad (Carrillo-Rodríguez, 2000).

4.3. Patogenia y Respuesta Inmunológica

Los rasgos más importantes de la enfermedad pueden englobarse en los siguientes puntos:

- Afectación bilateral y difusa de bronquiolos terminales, alvéolos e intersticio pulmonar.

- Inflamación constituida por un infiltrado celular mononuclear que frecuentemente deriva a la formación de granulomas y fibrosis.
- Presentación de la enfermedad con patrón agudo, subagudo o crónico.
- Detección en el suero de los pacientes de anticuerpos frente al antígeno responsable.

(Carrillo-Rodríguez, 2000; Patel *et al.*, 2001; Aguilar *et al.*, 2003; Mejia *et al.*, 2007; Woda, 2008)

No todos los antígenos inhalados tienen la capacidad para desencadenar la enfermedad. Aquellos que provocan neumonitis por hipersensibilidad poseen características que los diferencian, de aquellos que inducen asma, tales como su tamaño, solubilidad, naturaleza de la partícula y su capacidad de causar, además de la respuesta inmunológica, una respuesta inflamatoria inespecífica. Desde el punto de vista aerodinámico deben tener un tamaño entre 1 y 3 μm de diámetro, con el fin de alcanzar el alvéolo, a diferencia de los antígenos causantes de asma, que son mayores (diámetro de unos 30 μm). Además, son antígenos que se comportan como potentes adyuvantes en la respuesta inmunológica, pueden activar la cascada del complemento por la vía alterna, estimular a los macrófagos (ej. glucano de la pared celular de hongos) y la respuesta celular retardada. Por último, suelen ser resistentes a la degradación enzimática (mucina intestinal de la paloma) (Bourke *et al.*, 2001; Cebollero, 2005).

Además del antígeno, el tiempo de exposición es un factor importante en el desarrollo de la enfermedad. Se ha demostrado cómo una concentración elevada de antígeno aumenta la prevalencia de la enfermedad en el caso del pulmón de cuidador de aves y del pulmón de granjero (Malmberg *et al.*, 1993). La respuesta inmunológica en el paciente se caracteriza por la producción de anticuerpos específicos, principalmente de isotipo IgG, debida a la proliferación de células plasmáticas estimuladas por los linfocitos CD4+ Th1. Todo ello

ocurre después de que las partículas antigénicas hayan sido procesadas por los macrófagos. No sólo los individuos enfermos sino también la mayoría de individuos expuestos asintomáticos desarrollan lo que parece una respuesta inocua productora de IgG. La respuesta de anticuerpos no es suficiente para causar la enfermedad y se requiere también una respuesta citotóxica de linfocitos CD8+. Además para el desarrollo de la neumonitis parecen necesarios otros cofactores (Patel *et al.*, 2001).

Por otro lado, la existencia de una respuesta inflamatoria inespecífica parece ser el factor que en muchos casos de individuos sensibilizados pero sanos precipita el desarrollo de la enfermedad. Así, en algunos individuos expuestos durante varios años el inicio de los síntomas de la enfermedad puede ser precipitado por una infección respiratoria concurrente (Hinojosa. 2000, Patel *et al.*, 2001).

La neumonitis es un síndrome, ya que representa a un grupo heterogéneo de enfermedades con múltiples formas clínicas (aguda, subaguda y crónica). La forma aguda se observa en sujetos con una sensibilización previa y que se exponen a concentraciones altas del antígeno, las etapas subagudas y crónicas, tienen una exposición al antígeno en forma continua o intermitente y en concentraciones bajas (Mejía *et al.*, 2007; Selman *et al.*, 2010).

En la fase crónica, se forman inmunocomplejos antígeno-IgG que activan la cascada del complemento, liberando C5 que a su vez activa a los macrófagos. Los macrófagos activados secretan citocinas y quimiocinas que atraen al foco de infección, inicialmente neutrófilos y posteriormente linfocitos y monocitos. Algunas de estas quimiocinas (MIP-1a, IL-12) promueven la diferenciación de linfocitos CD4+ Th0 a Th1. Estos linfocitos Th1 liberan IFN- γ , considerado esencial en la formación de granulomas por parte de macrófagos. Por otro lado, la IL-6 promueve la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas y la maduración de las células CD8+ a citotóxicas (Hinojosa. 2000; Patel *et al.*, 2001).

Debido a que uno de los antígenos responsables en este padecimiento son las proteínas de aves, destacan la aparición de anticuerpos contra el antígeno aviario (AA), complejos inmunes circulantes (CIC), activación de complemento, y el incremento de otras inmunoglobulinas incluyendo anticuerpos contra péptidos pulmonares. En estudios previos se ha apreciado que los anticuerpos contra AA se presentan en neumonitis por hipersensibilidad (NH) respecto a los contactos sanos y se ha propuesto que estas anomalías pueden ser de utilidad en el diagnóstico al considerar distintas patologías intersticiales pulmonares. En particular al considerar las evidencias que sostienen que la neumonitis por hipersensibilidad a antígeno aviario (NHAA) parece ser mediada por CI (Aguilar *et al.*, 2003).

Entre las causas que pueden explicar la formación de CI, se encuentran los antecedentes inmunogenéticos que pueden estar relacionados con la capacidad de algunos anticuerpos para favorecer el proceso inflamatorio, activar linfocitos B, así como incrementar el número y/o función de los fagocitos (macrófagos y neutrófilos) ó células B, mediante la unión a distintos receptores Fc de IgG en estas estirpes celulares (Bourke *et al.*, 2001).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Neumonitis por Hipersensibilidad es un síndrome complejo en términos etiológicos y fisiopatológicos causado por una respuesta inmune exagerada. Afecta a un 7% de la población con un porcentaje de sobrevida del 10% a cinco años. En México la Neumonitis por hipersensibilidad se debe principalmente a antígenos de paloma (Antígeno aviario) lo que ocasiona alteraciones en la respuesta inmune a través de los receptores FcγRIIIB, ya que normalmente están involucrados en mecanismos de eliminación de complejos inmunes y fagocitosis, a algunos polimorfismos se les relaciona con diversas enfermedades autoinmunes, como Artritis reumatoide y Lupus eritematoso, pero se desconoce si estos participan en el desarrollo de la Neumonitis por Hipersensibilidad ya que una de las características que presenta la enfermedad es la formación de complejos inmunes circulantes y niveles elevados de anticuerpos de la clase IgG, IgM e IgA así como la presencia de Factor reumatoide.

6. HIPÓTESIS

El polimorfismo NA2 del Receptor FcγRIIIB puede contribuir en la susceptibilidad para el desarrollo de Neumonitis por Hipersensibilidad.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Establecer la frecuencia de los alélos polimórficos NA1, NA1/NA2 y NA2/NA2 en pacientes con Neumonitis por Hipersensibilidad, Contactos Asintomáticos y Controles Sanos.

7.2. Objetivos secundarios

- Extraer ácidos nucleicos (ADN Y ARN) de biopsias de pulmón de pacientes con Neumonitis por hipersensibilidad y muestras de sangre periférica de donadores sanos y contactos asintomáticos.
- Realizar ADNc a partir de ARNm para determinar la expresión del receptor FcγRIIIB por medio de PCR
- Determinar la presencia del gen y establecer si existe el polimorfismo por medio de PCR Alelo específica.
- Comparar los resultados de pacientes con contactos asintomáticos y controles sanos y establecer si existe una asociación entre ellos y la presencia del polimorfismo.

8. MÉTODOS

8.1. Tipo de Estudio

Observacional, Descriptivo, Transversal.

8.2. Grupo de Estudio

Se estudiaron 3 grupos de 20 sujetos cada uno.

1. Un grupo de 20 pacientes con Neumonitis por hipersensibilidad con edades desde 30 hasta 60 años con un promedio de 44 años, 0 hombres y 20 mujeres.
2. Un grupo de 20 sujetos que han estado en contacto con el antígeno por largos periodos de tiempo que se les da seguimiento por la exposición pero no desarrollan la enfermedad ni sintomatología a los que llamamos contactos asintomáticos con edades desde 18 años hasta 43 años con un promedio de edad de 32 años, 15 hombres y 5 mujeres.
3. Un grupo de 20 controles sanos que no han estado expuestos al antígeno ni tienen la enfermedad con edades desde 20 años hasta 35 años con un promedio de 24 años, 10 hombres y 10 mujeres.

8.3. Criterios de exclusión:

Se excluyen todos los sujetos que tengan otra complicación o enfermedad que no sea Neumonitis por Hipersensibilidad.

8.4. Criterios de inclusión

Solo pacientes que presenten Neumonitis por Hipersensibilidad. Como único padecimiento y que no estén bajo tratamiento médico.

8.5. EXTRACCION DE ACIDOS NUCLEICOS

8.5.1. Extracción de ARN

Se utilizaron biopsias de pulmón de pacientes con Neumonitis por hipersensibilidad. Se empleó la técnica de trizol que consiste en:

Homogenización: los tejidos fueron macerados en un polytron con 1ml de TRIZOL® Reagent GIBCOBRL

Separación de fases: se incubo 5 minutos a una temperatura de 15 a 30°C esto para permitir la disociación de los complejos núcleos proteicos, se agregaron 200µl de cloroformo después se puso en vortex 15 segundos y se dejo a temperatura ambiente, posterior a este paso se centrifugo por 15min a 12000 RPM a -4°C para obtener la separación de fases.

Precipitación ARN: se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo al que se le agregaron 750µl de alcohol isopropilico y se dejo a -30°C toda una noche, para precipitar el ARN

8.5.2. Extracción de ADN

Esta se hizo después de remover la fase acuosa del RNA.

Precipitación del ADN: se agregaron 300µl de etanol al 100% y se dejo por 3 minutos a -30°C, se centrifugo por 5 minutos a 2000 RPM a -4°C, ya realizado este paso se procedió a remover la fase acuosa.

Se hicieron 2 lavados con 1ml de una solución de citrato de sodio y se dejaron 30 minutos a -30°C, después se centrifugo 5 minutos a 2000 RPM a -4°C. Se decanto y re suspendió con 1.5 ml de etanol al 75% y se metieron 20 minutos a -30°C por ultimo se centrifugo por 5 minutos a 2000 RPM a -4°C, se decanto y dejo secar el botón a temperatura ambiente, una vez seco se procedió a disolver con 60µl de agua libre de ADN asas (agua DEPC).

Para la extracción de ácidos nucleicos de los controles se utilizaron muestras de sangre periférica, se aplicaron técnicas de lisis de eritrocitos para aislar células blancas y a partir de ellas extraer DNA y RNA.

8.5.3. Obtención de Células Blancas de Sangre Periférica

Se obtuvieron 500µl de sangre a los cuales se les agrego 500µl de solución de lisis, se dejaron por 30 minutos a -4°C, se centrifugo por 2 minutos a 14000 RPM, se decanto y lavo con 500µl de la solución de lisis, se hicieron 3 lavados, cuando el botón se noto de color blanco se procedió con la extracción de ácidos nucleicos.

Al tubo eppendorf en el que se encontraba el botón se agregó solución salina al 0.9%, NaCl 5 mM, se mezclo con vortex y centrifugo a 12000 RPM, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo al cual se le agregaron SDS al 10% y una mezcla de cloroformo-alcohol isopropilico (49:1), se mezclo con vortex y se centrifugo a 12000 RPM, se transfirió la fase acuosa a otro tubo que tenia etanol al 100% y se dejo toda una noche a -30°C, se recupero el ADN en un tubo nuevo que contenía alcohol al 70%, se centrifugo a 12000 RPM a -4°C, se decanto y dejo secar a temperatura ambiente, ya seco se disolvió en 60 µl de agua DEPC.

Para obtener una mejor calidad de RNA de las muestras de biopsias y controles la extracción se realizó utilizando un RNeasy mini kit (50) QIAGEN 74104. Y se recuperó en agua DEPC.

8.6. Integridad y Pureza

Se observó la integridad de los ácidos nucleicos por medio de electroforesis (anexos) en gel de agarosa al 2% (anexos) con un intercalante de DNA en este caso SYBR Green utilizando un transiluminador de luz UV. Para conocer la pureza se utilizó un espectrofotómetro y se realizaron las medidas de absorbancia a 260 y 280nm

8.7. RT- PCR (ADNc)

Se partió de ARNm y se utilizó RT Omniscript. dNTP's 5.0 mM, Oligo (dt), RNase inh GIBCOBRL y agua cuanta baste para la reacción deseada, utilizando el termociclador 480 de Perkin Elmer, una hora a 37° C, 15 minutos a 93° C.

Posteriormente se hizo tratamiento con RNase H invitrogen 20 minutos a 37° C.

8.8. PCR

La PCR (anexos) se llevó a cabo utilizando los siguientes primers sentido NA1; 5' GCC TCA TCT CAA GCC AGG CC 3'; anti sentido NA1; 5' CTC AAT GGT TGC ACA GCG TT 3', Sentido NA2; 5' GCC TCA TCT CAA GCC AGG CC 3' anti sentido NA2: 5' AAC GAC AGT GGA GAG TAC AGG TG 3'. Específicos para NA1 DE 118 pb y Na2 172 pb. Para la amplificación de

GAPDH se utilizaron los siguientes primers: sentido 5' TG ATGACATCAA GAAGGTGGTG AAG 3', anti sentido 5' A TGG CCCACAT GGCCTCCAAG GA 3'. Específicos para GAPDH de 344 pb.

Para las PCR tanto de DNA genómico como de ADNc se empleó una cantidad de 2µl de muestra para ambos casos y se utilizó Gold Polimerasa PROMEGA; MgCl₂ 25 Mm; DNTP's 10 Mm; Buffer de tris-HCl, KCl y agua para la reacción, utilizando el termociclador 480 de Perkin Elmer, se amplificó 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización inicial de 94° C por 5 minutos y una temperatura media de 63°C y una polimerización a 72°C. Para observar los productos se realizó una electroforesis de agarosa al 2% utilizando SYBR Green y se utilizó un transiluminador de Luz UV.

8.9. Análisis Estadístico

Se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg (anexos) en la población estudiada y para el análisis de la frecuencia alélica se aplicó la prueba F exacta de Fisher.

9. RESULTADOS

Mediante este trabajo se identificó la presencia del polimorfismo genómico y de los transcritos, en tejidos de pulmón de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad, muestras de sangre periférica de controles sanos y contactos asintomáticos de Neumonitis por Hipersensibilidad.

Para la identificación de los polimorfismos en el DNA genómico y RNA de los tejidos y muestras de sangre, se verifico la integridad de ambos ácidos nucleicos mediante un gel de agarosa al 1.5% donde se observo que la mayoría de las extracciones se hizo de forma correcta, la integridad de los ácidos se verifico observando el gel, en el cual se tenían que observar unas bandas integras y bien definidas, en el caso de observar una banda degradada o barrida se desechaba esa muestra (Fig. 3 y 4). Se calculo la pureza de las extracciones mediante la relación de absorbancias a 260 nm y 280 nm, usando un espectrofotómetro, se obtuvieron purezas mayores o iguales a 1.5 en la mayoría de las muestras procesadas (Tabla 2).

Una vez establecida la integridad y pureza del DNA se procedió al ensayo de PCR alelo específico.

Para llevar acabo los ensayos de PCR se utilizaron los oligonucleótidos específicos para cada uno de los alélos. Para GAPDH cuyo transcrito fue considerado un control constitutivo, se utilizaron oligonucleótidos diseñados para humano. Como resultado de los ensayos de PCR alelo específico se obtuvieron los productos amplificados de los tamaños esperados tanto de DNA genómico como de ADNc: 344pb para GAPDH

Figura 5. Carriles 2 y 3 se observa una banda de aproximadamente 344pb correspondiente al gen constitutivo GAPDH que corresponde a muestras de ADN genómico de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad, carriles 6, 7 se observa una banda de aproximadamente 344pb correspondiente al tamaño esperado para GAPDH estos productos corresponden a muestras de

ADNc pertenecientes a contactos asintomáticos, carril 8 se observa una banda de aproximadamente 344pb que corresponde al tamaño esperado para GAPDH, esta muestra corresponde a un control sano.

Figura 6. Se obtuvo el tamaño esperado para los productos del amplificado de 171pb para NA2, 118pb para NA1, se colocaron dos muestras, una de pacientes asintomáticos (carriles 2, 5) y otra de los controles sanos (carriles 1, 4), en los extremos se colocó un control negativo por los 2 grupos,

Figura 7. Se observa el producto de los amplificados de la PCR que realizó para las muestras de los pacientes con neumonitis por hipersensibilidad, carril 1 se colocó un control negativo, carriles 2, 3, 4 y 5 se cargaron controles positivos de muestras previamente realizadas de personas sanas, carril 14 se colocó el marcador de peso molecular de 100 pares de bases, carriles 6-13, 15-26 se colocaron muestras de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad, se observó que todos los amplificados dieron positivo para NA1.

Figura 8. Se observa un amplificado de aproximadamente 171pb correspondiente al tamaño esperado para NA2, las muestras corresponden a pacientes con neumonitis por hipersensibilidad, carril 1 marcador de peso de 100pb, carril 2-9 se colocaron muestras de pacientes con neumonitis, carril 10 se cargó un control positivo de control sano, carril 11 se colocó un control negativo. En los experimentos realizados con las muestras de pacientes obtuvimos resultados similares en comparación con los contactos asintomáticos y controles sanos.

En la tabla 3 representamos los resultados obtenidos del ensayo de PCR a partir de DNA genómico y ADNc; los resultados conseguidos fueron iguales para ADN genómico como para el ADN complementario. Se calculó la frecuencia alélica a partir de las frecuencias genotípicas (anexos) obtenidas del ensayo de PCR, para los pacientes con neumonitis obtuvimos una

frecuencia alélica del 92.5% para NA1 y 7.5% para NA2 en comparación con los grupos control en la cual la presencia alélica para NA1 y NA2 fue de 55%, 45% para los contactos asintomáticos, para los controles sanos la frecuencia alélica fue de 70% para NA1 y 30% para NA2.

Para analizar los resultados de las frecuencias alélicas se utilizó una F exacta de Fisher con una $P < 0.05$, se decidió utilizar esta prueba por nuestro tamaño de muestra; en los resultados obtenidos observamos que al contrastar los pacientes con neumonitis por hipersensibilidad contra los controles asintomáticos nuestro resultado es estadísticamente significativo, obteniendo una $p = 0.000121$, cuando se hizo la comparación de los pacientes con Neumonitis por Hipersensibilidad con los controles sanos se obtiene un resultado de $p = 0.010$ lo que sugiere una significancia estadística. Al contrastar los grupos de contactos asintomáticos contra controles nuestra prueba estadística nos dio una $p = 0.124$ lo que sugiere que no hay significancia estadística.

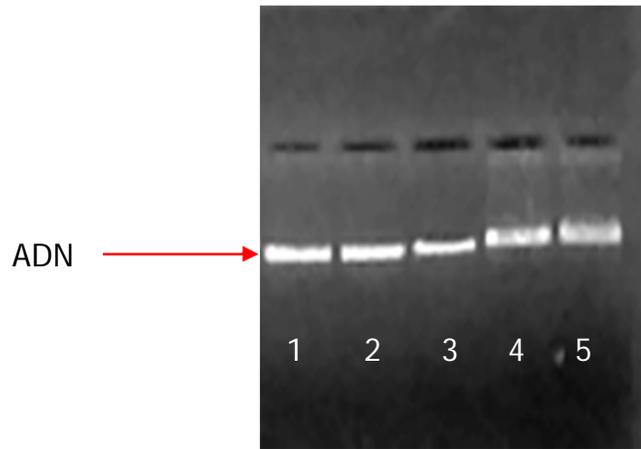


Figura 3. Gel de agarosa al 1.5% para visualizar integridad del DNA. Carriles 1, 2 y 3; se observa un ADN de integridad muy buena; carriles 4 y 5; observamos un DNA un poco degradado.

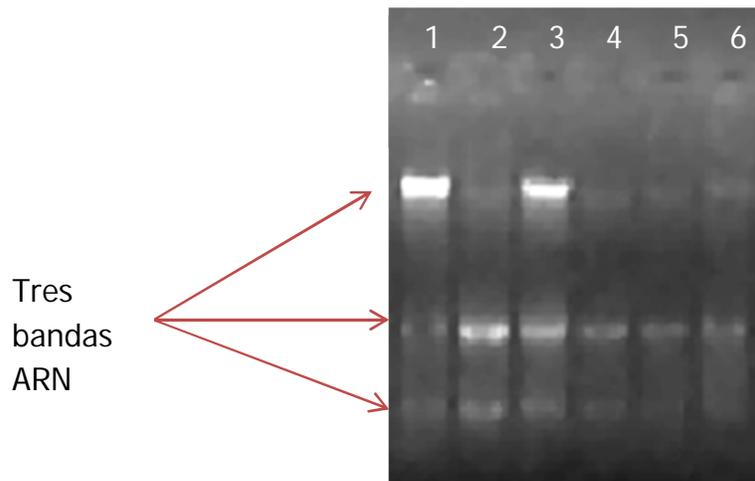


Figura 4. Gel de agarosa al 1.5% para visualizar integridad del RNA total. Se observan 3 bandas lo cual nos indicó que la extracción fue buena.

Valores promedio de las absorbancias

	A260	A280	Pureza
NH			
RNA	0.023	0.012	1.91
NH			
DNA	0.050	0.029	1.72
CA			
RNA	0.029	0.015	1.93
CA			
DNA	0.028	0.018	1.55
CS			
RNA	0.026	0.014	1.85
CS			
DNA	0.023	0.015	1.53

TABLA 2. Resultados de las medidas de absorbancia para calcular las purezas de los ácidos nucleicos. NH: biopsias de pulmón, CA: control asintomático, CS: control sano.

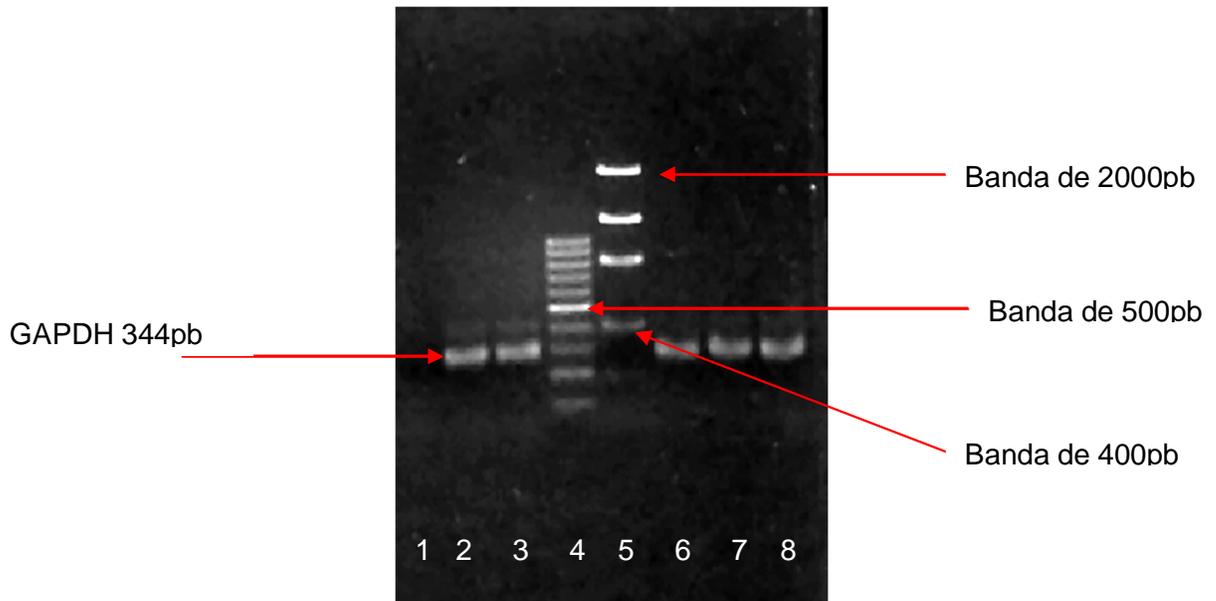


Figura 5. Gel de agarosa al 2% para revelar la presencia de GAPDH. Carril 1 control negativo, carriles 2, 3, 6, 7y 8 se observa un amplificado de aproximadamente 344pb; Carril 4 marcador de peso molecular de 100pb; carril 5 marcador de peso molecular de 100pb a 2000pb

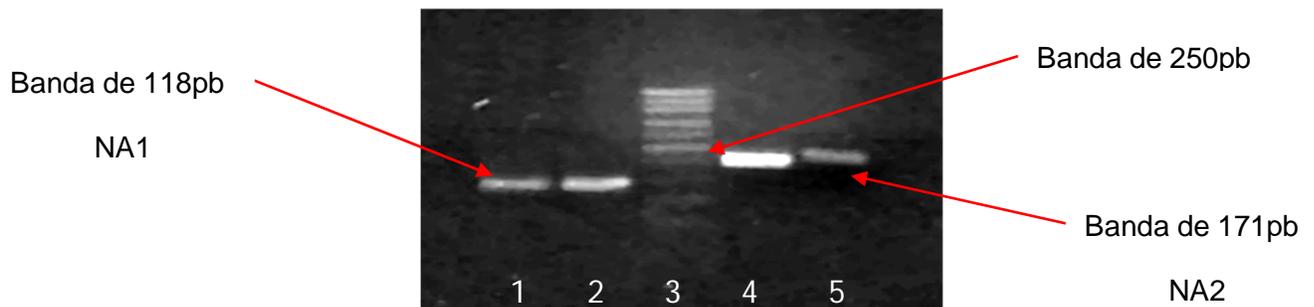


Figura 6. Gel de agarosa al 2% para NA1/NA2, controles sanos y pacientes asintomáticos, donde observamos en los carriles 1 y 2 NA1 con un peso de 118pb, carril 3 marcador de peso de 50pb (50p a 500pb), carriles 4 y 5 NA2 con un peso de 171pb.

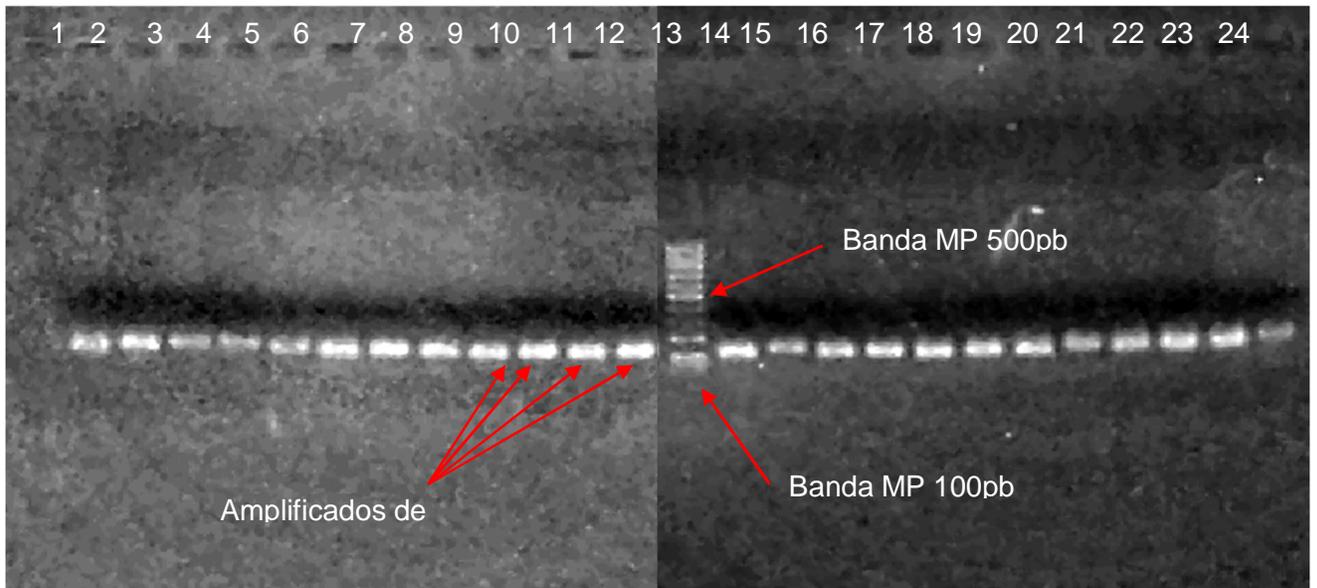


Figura 7. Gel de agarosa al 2% para NA1, se puede observar que el producto amplificado fue de aproximadamente 118 pb. Carril 15 Marcador de Peso (MP) de 100 pb.

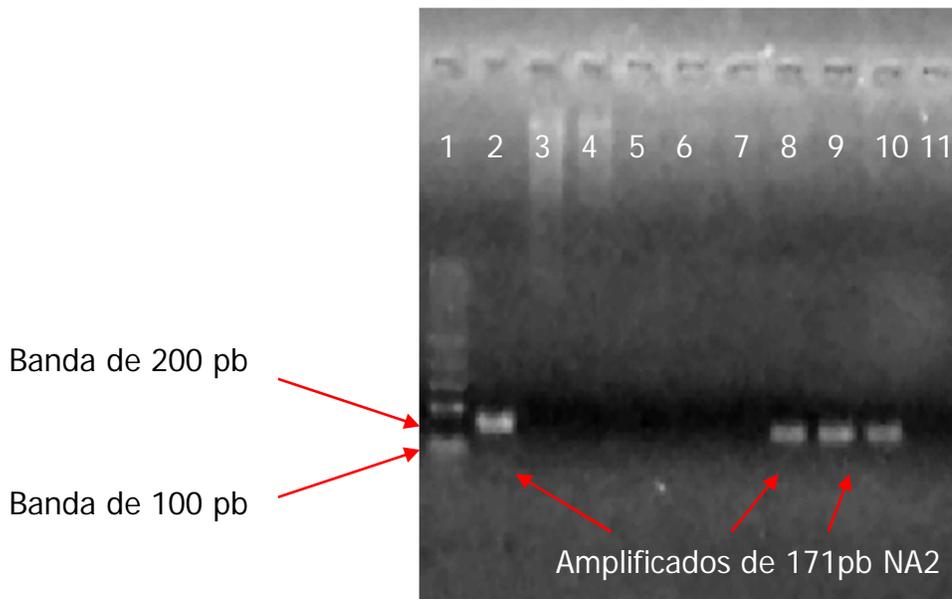


Figura 8. Gel de agarosa al 2% para NA2, se puede observar que el producto del amplificado fue de aproximadamente 171 pb. Carril 1 Marcador de Peso (MP) de 100 pb.

Frecuencia genotípica y alélica del receptor FcγRIIIB

	NH	%	Control asintomático	%	Control sano	%
Frecuencia genotípica						
NA1-NA1	17	85	4	20	11	55
NA1-NA2	3	15	14	70	6	30
NA2-NA2	0	-	2	10	3	15
Frecuencia alélica						
NA1	0.925	92.5	0.55	55	0.70	70
NA2	0.075	7.5	0.45	45	0.30	30

Resultados prueba estadística F exacta de Fisher

NH Vs Control asintomático	P= 0.000121
NH Vs Control sano	P= 0.010
Control asintomático Vs Control sano	P= 0.124

TABLA 3. Resultados obtenidos de la amplificación partiendo de DNA genómico y resultados obtenidos de la prueba estadística F exacta de Fisher P <0.05

10. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En éste trabajo se tuvieron tres grupos de estudio. a) Pacientes con neumonitis por hipersensibilidad b) Contactos asintomáticos y c) un grupo de controles sanos sin historia de contacto con aves, observándose que el polimorfismo NA2 no se presenta de manera similar en los tres grupos ya que se muestra una mayor frecuencia alélica en el grupo de asintomáticos con respecto a pacientes con Neumonitis siendo ésta de 45% y 7.5% respectivamente, mientras que en los sanos sin contacto fue de 30%. Se observan resultados iguales tanto en muestras de ADN como de ADNc ya que la distribución alélica fue exactamente la misma para ambas muestras lo que nos habla de una expresión igual a lo codificante.

Por otra parte, fue interesante que todos los pacientes con Neumonitis fueron mujeres, en las cuales la presencia del alelo NA1 fue mayor y además, la más alta frecuencia del polimorfismo NA2 en nuestro grupo de estudio ocurrió en hombres. La distribución y diferencias de los alelos que encontramos en este trabajo no son influidas por la mayor frecuencia de Neumonitis en mujeres, y consideramos que son factores independientes, en términos de susceptibilidad o resistencia a la enfermedad.

En estudios previos en nuestro grupo de trabajo hemos encontrado que no hay significancia estadística de asociación del polimorfismo NA2/NA2 en muestras de sangre periférica de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad y controles sanos.

En éste caso se planteo la posibilidad de la implicación del polimorfismo NA2 del receptor Fc gamma RIIIb con la Neumonitis que es un tipo de hipersensibilidad en donde se ve alterada la respuesta inmune, así como la presencia de Complejos inmunes circulantes (CIC) y se observa que realmente este polimorfismo tiene alguna implicación obteniéndose una $P=0.000121$ en el análisis estadístico de pacientes con Neumonitis contra

contactos asintomáticos y una $P= 0.010$ para el grupo de Neumonitis respecto a los controles sanos. No se observa significancia estadística para el grupo de asintomáticos contra sanos, lo cual es esperado ya que el grupo de asintomáticos no desarrollaron la enfermedad.

La mayoría de pacientes con Neumonitis presentan el alelo silvestre y los asintomáticos el polimorfismo NA2 razón por la cual consideramos que éste polimorfismo está implicado en algún tipo de protección, desde luego mucho más complejo que solo la presencia y expresión de este gen, evitando que este grupo de estudio desarrollara la enfermedad.

Se ha observado la presencia del polimorfismo NA2/NA2 en enfermedades inmunológicas como Artritis Reumatoide (AR), Lupus Eritematoso sistémico (LES) y nefritis lúpica (Hatta *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 2005). En las cuales se observa una relación de estos polimorfismos con cambios en la respuesta inmunológica a través de receptores Fc.

Los resultados de los amplificadores del polimorfismos del gen FcyRIIIB no son tajantes ya que no se han realizado suficientes investigaciones como para llegar a conclusiones definitivas, por lo que se requerirá más información tanto para conocer su papel en la fisiopatología y su asociación con la enfermedad.

El estudio de marcadores genéticos como factores de riesgo para el desarrollo de alguna enfermedad es importante ya que con el avance de la investigación, este conocimiento puede llevar a crear nuevos medicamentos que actúen sobre el producto de estos alelos y puedan funcionar como tratamiento de la enfermedad.

11. CONCLUSIONES

1. El polimorfismo NA2/NA2 del receptor Fc gamma RIII B muestra diferencias estadísticamente significativas entre Neumonitis por Hipersensibilidad y contactos asintomáticos, lo que nos sugiere una asociación de éste polimorfismo con la enfermedad.
2. Es posible que el polimorfismo NA2/NA2 del receptor Fc gamma RIIB este asociado a mecanismos complejos de protección que no parecen permitir el desarrollo de Neumonitis por Hipersensibilidad.

12. ANEXO 1

12.1. PCR

La PCR por sus siglas en inglés (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es una técnica que nos permite amplificar *in vitro* gran cantidad de veces una secuencia específica de DNA conociendo las secuencias que lo flanquean.

Las aplicaciones de la técnica son muchas entre las que destacan:

Expresión génica, detección de mutaciones, seguimiento de enfermedades con tratamiento de fármacos, diagnóstico de enfermedades y determinación de paternidad entre muchas otras de gran importancia (Erlich y Arnheim., 1992).

Este método fue establecido por el investigador Kary Mullis en 1985 y vino a revolucionar y a cambiar en corto tiempo la Biología Molecular. En la técnica se emplea la enzima taq DNA polimerasa que es capaz de actuar entre los 75-95 grados centígrados por más de 2 horas razón por la cual es efectiva para ésta técnica que requiere de una cantidad de ciclos en éste rango de temperatura para poder amplificar el segmento de DNA requerido millones de veces (Saiki et al., 1988).

La PCR consta de un primer paso de desnaturalización inicial entre 80-95^ac separando las dos cadenas por el rompimiento de puentes de Hidrógeno y posteriormente una temperatura de Alineación en donde se lleva a cabo la hibridación de los cebadores (primers) y esta puede ser entre 50-70 °C. La tercera etapa es una reacción de extensión que normalmente se lleva a cabo a 72 °C y es en la cual la enzima polimerasa lleva a cabo su función construyendo la cadena con los nucleótidos complementarios de acuerdo a la cadena molde. Todo este proceso se repite una serie de ciclos entre 35-40 lo que nos permite obtener un amplificado de millones de copias del fragmento de DNA deseado (Davis et al., 1986).

12.2. Electroforesis

La electroforesis en gel es un método que se emplea para separar moléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas. El término electroforesis describe la migración de las partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico. «Electro» se refiere a la electricidad y «foresis», del griego *phoros*, significa «trasladar». Así pues, la electroforesis en gel es una técnica consistente en aplicar corriente eléctrica a las moléculas para que atraviesen una placa de gel. (Birren, 1999)

La concentración e integridad del ADN extraído, así como el tamaño de distintos fragmentos de ADN (por ejemplo, productos de PCR) pueden ser verificadas mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. La electroforesis consiste en la separación de moléculas (proteínas, ácidos nucleicos) a través de una matriz tamponada (agarosa, acrilamida). En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable por la fuerte carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis (Griffiths et al., 1996)

La velocidad de separación de fragmentos de ADN por electroforesis es regulada por la concentración de agarosa (o acrilamida) en el gel y el voltaje aplicado durante la electroforesis. La agarosa funciona como un filtro en el que los fragmentos de menor tamaño migran más rápidamente hacia el ánodo que aquellos de mayor tamaño. Al aumentar la concentración de agarosa se dificulta el movimiento de los fragmentos a lo largo del gel, permitiendo obtener una mayor resolución en los fragmentos de menor longitud (Birren, 1999).

Los ácidos nucleídos separados en geles de agarosa pueden visualizarse mediante tinción con colorantes fluorescentes, lo cual permite evaluar su integridad y estimar su concentración mediante un análisis comparativo con patrones de concentración conocida. Los colorantes fluorescentes actúan mediante inserción entre las pares de bases que conforman el ácido nucleíco.

El bromuro de etidio es ampliamente utilizado para la visualización de ADN y ARN. Sin embargo, éste es un reactivo altamente tóxico, con propiedades mutagénicas. En la actualidad existen colorantes fluorescentes alternativos, como SYBR Safe, SYBR Gold, SYBR Green I, Vista Green y Syto60, desarrollados específicamente para reducir los riesgos potenciales de mutagénesis (Davis et al., 1986).

12.3. Equilibrio Hardy- Weinberg

Se dice que una población está en equilibrio cuando los alelos de los sistemas polimórficos mantienen su frecuencia en la población a través de las generaciones.

Para lograr el equilibrio genético, según el matemático inglés Hardy y el médico alemán Weinberg, se deben dar varias condiciones:

- a. La población debe ser infinitamente grande y los apareamientos al azar (panmícticos).
- b. No debe existir selección, es decir, cada genotipo bajo consideración debe poder sobrevivir tan bien como cualquier otro (no hay mortalidad diferencial) y cada genotipo debe ser igualmente eficiente en la producción de progenie (no hay reproducción diferencial).
- c. No debe existir flujo génico, es decir, debe tratarse de una población cerrada donde no haya inmigración ni emigración.
- d. No debe haber mutaciones, a excepción que la mutación se produzca en sentido inverso con frecuencias equivalentes, por ejemplo, A muta hacia A' con la misma frecuencia con la que A' muta hacia A.

Toda demostración de la ley de Hardy-Weinberg implica el principio básico de la teoría de la probabilidad, esto es, que la probabilidad de ocurrencia simultánea de dos o más eventos independientes es igual al producto de las probabilidades

de cada evento. Normalmente, la frecuencia de cada alelo representa su probabilidad de ocurrencia. De modo que para obtener la probabilidad de un genotipo dado en la progenie, se multiplican las frecuencias de los alelos involucrados entre sí. Dadas las frecuencias génicas (alélicas) en el pool génico de una población, es posible calcular las frecuencias esperadas de los genotipos y fenotipos de la progenie. Si p = porcentaje del alelo A (dominante) y q = el porcentaje del alelo a (recesivo), se puede utilizar el método del damero para producir todas las posibles combinaciones al azar de estos gametos (Tabla 4).

Combinaciones posibles

Hembras			
	Gametos	p (A)	q (a)
Machos	p (A)	p^2 (AA)	pq (Aa)
	q (a)	pq (Aa)	q^2 (aa)

Tabla 4. Posibles combinaciones al azar

Obsérvese que $p + q = 100\%$ (o 1), es decir, los porcentajes de los gametos A y a deben igualar al 100%) para incluir a todos los gametos del pool génico. De este modo, si solo conozco la frecuencia de un alelo y sé que el sistema genético analizado solo tiene 2, puedo calcular la frecuencia del segundo. Más fácilmente, puedo expresar p y q como proporciones, igualando $p + q = 1$. Las frecuencias genotípicas (cigóticas) en la siguiente generación sumadas también deben igualar 1 o 100%, y pueden resumirse como sigue:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

AA Aa aa

Tomado de Stark, 2005 y Griffiths et al., 2008

En ausencia de factores disruptivos (mutación, flujo génico desbalanceado, selección natural y deriva génica), las frecuencias alélicas y genotípicas en un locus de una población diploide panmíctica se repetirán de generación en generación.

12.4. Cálculo de Frecuencias Alélicas a Partir de Frecuencias Genotípicas

La frecuencia génica es la característica de interés en cuanto a la transmisión de los genes en una población. En lo que respecta a los patrones de herencia de los individuos, es de importancia la *frecuencia genotípica*, relacionada matemáticamente con la frecuencia génica.

Suponiendo:

- Un locus autosómico con dos alelos (A y a) y tres genotipos posibles (AA, Aa, and aa);
- Una muestra grande de individuos de la población considerada;

Se ha de obtener:

1. El tamaño de la muestra (N) y
2. El número de total de individuos para cada genotipo (AA, Aa y aa), de modo que $N = AA + Aa + aa$.

A partir de esto, se puede obtener la frecuencia de cada alelo, observando lo siguiente:

- Los individuos AA portan exclusivamente alelos A, mientras que este alelo constituye la mitad de la carga alélica en dicho locus en los individuos Aa.
- Del mismo modo para el alelo a, los individuos aa portan exclusivamente alelos a, mientras que los individuos Aa tienen la mitad de sus alelos a.
- Por lo tanto, la contribución de cada individuo al *pool* génico puede medirse por la probabilidad de aportar un alelo dado:

Para el genotipo AA: $p(A) = 1.0$ y $p(a) = 0.0$

Para el genotipo Aa: $p(A) = 0.5$ y $p(a) = 0.5$

Para el genotipo aa: $p(A) = 0.0$ y $p(a) = 1.0$

- Sobre esta base, y dividiendo por N, se pueden obtener las frecuencias alélicas:

$$p = \frac{1.0 (AA) + 0.5 (Aa)}{N}$$

$$q = \frac{1.0 (aa) + 0.5 (Aa)}{N}$$

Siendo **p** la frecuencia de A y **q** la frecuencia de a.

El total de las probabilidades debe ser 1. De modo que $p + q = 1$, $p = 1 - q$,
 $q = 1 - p$.

Tomado de Ceppellini et al., 1955 y Griffiths et al., 2008.

13. ANEXO 2

13.1. SOLUCIONES

TAE 10x (1Lt) para preparar geles

48.45 g TRIS Base
sodio)

11.42 ml Ácido acético

20 ml EDTA 0.5 M pH 8.0

SDS 10% (50 ml)

5 g SDS (dodecilsulfato de

50 ml Agua libre de DNAsas

NaCl 5.0 mM (50 ml)

0.0147 g NaCl

50 ml Agua libre de DNAsas

Solución de lisis (100 ml)

0.829 g NH₄Cl

0.0037 g EDTA

0.1 g NaHCO₃

AGAROSA 2% (100ml)

2 g Agarosa

100 ml Agua libre de DNAsas

14. GLOSARIO

AA: antígeno aviario

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN de cadena sencilla. Se sintetiza a partir de una hebra simple de ARNm maduro. Se suele utilizar para la clonación de genes propios de células eucariotas en células procariontas, debido a que, dada la naturaleza de su síntesis, carece de intrones

Adyuvantes: son agentes que potencian la respuesta inmunitaria frente a los antígenos con los que se encuentran mezclados.

Alelo: es cada una de las formas alternativas que puede tener un gen que se diferencian en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen.

Alvéolo: son los divertículos terminales del árbol bronquial, en los que tiene lugar el intercambio gaseoso entre el aire inspirado y la sangre.

Antígenos: sustancia extraña al organismo capaz de inducir una respuesta inmunitaria, es decir, capaz de provocar la aparición de anticuerpos o de células que actúan sobre ella.

ARNhn: ARN nuclear heterogéneo (hnRNA) o transcrito primario. Este transcrito tiene unos 8.000 nucleótidos (llegando hasta 20.000) y contiene *segmentos que se traducirán* como aminoácidos (exones).

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

Células CD4+: conocidos como linfocitos T efectores son un subgrupo de linfocitos (a su vez un tipo de leucocito) que tienen un papel muy importante en establecer y maximizar las capacidades de defensa del sistema inmunitario.

Células CD8+: Neutralizan células infectadas por microorganismos intracelulares, mediante un ataque directo a las células infectadas, inyectando enzimas tóxicas que provocan su destrucción. Se les llama comúnmente CD8+, por la presencia del receptor de membrana CD8.

Células plasmáticas: se originan en los tejidos linfáticos por diferenciación de linfocitos B activados y llegan a los tejidos conjuntivos por la circulación sanguínea. Su función es sintetizar y secretar los anticuerpos, moléculas que pertenecen a una familia de proteínas específicas llamadas inmunoglobulinas.

CI: complejo inmune compuesto molecular formado por el enlace de un anticuerpo a un antígeno soluble.

CIC: complejo inmune circulante

Citofílicas: con propensión a unirse a células.

Citocinas: proteínas que regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares. Son los agentes responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas. Son producidas fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polimorfonucleares (PMN), células endoteliales, epiteliales y del tejido conjuntivo. Según la célula que las produzca se denominan linfocinas (linfocito), monocinas (monocitos, precursores de los macrófagos) o interleucinas (células hematopoyéticas). Su acción fundamental es en la regulación del mecanismo de la inflamación.

Enfermedades autoinmunes: enfermedad causada porque el sistema inmunitario ataca las células del propio organismo. En este caso, el sistema inmunitario se convierte en el agresor y ataca a partes del cuerpo en vez de

protegerlo. Existe una respuesta inmune exagerada contra sustancias y tejidos que normalmente están presentes en el cuerpo.

Fagocitosis: es un tipo de endocitosis por el cual algunas células rodean con su membrana citoplasmática a una sustancia extracelular (un sólido generalmente) y la introducen al interior celular.

FcγR: receptor específico de superficie, que se une a la porción carboxiterminal de la inmunoglobulina G. Existen varias clases de receptores Fc g, dentro de los cuales se incluyen los de alta afinidad (FcγRI), que intervienen en la fagocitosis en macrófagos y neutrófilos y los de baja afinidad que activan células como las NK (FcγRIIIB), o inhiben señales de transducción celular (FcγRIIB).

Glicoproteínas: moléculas compuestas por una proteína unida a uno o varios hidratos de carbono, simples o compuestos. Tienen entre otras funciones el reconocimiento celular cuando están presentes en la superficie de las membranas plasmáticas.

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

Hipersensibilidad: se refiere a la excesiva o inadecuada respuesta inmunitaria frente a antígenos ambientales, habitualmente no patógenos, que causan inflamación tisular y malfuncionamiento orgánico

IFN-γ: interferón gamma, es un tipo de citosina producida por los linfocitos T y natural killer (NK) cuya función más importante es la activación de los macrófagos, tanto en las respuestas inmunitaria innatas como las respuestas celulares adaptativas.

IgA: inmunoglobulina A es la clase predominante de anticuerpo en las secreciones seromucosas del organismo como saliva, lágrimas, calostro, leche y secreciones respiratorias, gastrointestinales y genitourinarias.

IgG: inmunoglobulina G es una de las cinco clases de anticuerpos humorales producidos por el organismo. Inmunoglobulina predominante en los fluidos internos del cuerpo, como son la sangre, el líquido cefalorraquídeo y el líquido peritoneal (líquido presente en la cavidad abdominal).

IgM: Inmunoglobulina M la más primitiva y la más frecuente durante la respuesta primaria caracterizada por ser un pentámero y por su gran peso molecular lo que origina su situación exclusivamente intravascular.

IL-12: citosina proinflamatoria producida en los macrófagos, monocitos y otras células presentadoras de antígenos.

IL-6: citosina con actividad antiinflamatoria y proinflamatoria.

LES: Lupus Eritematoso sistémico

Mastocitos: se originan en las células madre de la médula ósea, actuando en la mediación de procesos inflamatorios y alérgicos. Se encuentran en la mayoría de los tejidos del cuerpo, sintetizan y almacenan histamina.

MIP-1 α : proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa.

NA2: antígeno neutrofilico 2 (Fc γ RIIIB).

NH: neumonitis por hipersensibilidad.

NHAA: neumonitis por hipersensibilidad a antígeno aviario.

Opsonización: proceso por el que se marca a un patógeno para su ingestión y destrucción por un fagocito.

Panmíctica: población que se aparee totalmente al azar; las poblaciones panmícticas se llaman a menudo demes.

PCR Alelo específica: esta técnica es usada para identificar los polimorfismos de una sola base (SNPs).

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

Polimorfismo de nucleótido simple: SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*, pronunciado **esnip**) es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base de una secuencia del genoma.

Polimorfismo: variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población. Una de estas variaciones debe darse al menos en un 1% de la población para ser considerada como polimorfismo.

Quimiocinas: proteínas de pequeño tamaño pertenecientes a una familia de las citocinas. Se llaman de este modo debido a la capacidad que tienen para inducir la quimiotaxis en las inmediaciones de las células sensibles, son citoquinas quimiotácticas. Las quimiocinas presentan una serie de características estructurales comunes, tales como su pequeño tamaño o la presencia de cuatro residuos de cisteína.

Quimiotaxis: Proceso por el cual los leucocitos son atraídos a la vecindad de los agentes invasores.

Saccharopolyspora rectivirgula: Bacteria Gram positiva, no ácido-alcohol resistente, termófila, que presenta filamentos largos y ramificados, de 1-2 μm de diámetro.

15. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. **2001**. Inmunología celular y molecular. McGraw Hill Interamericana. 321-323.
2. Aguilar León D.E., Novelo Retana V., Martines-Cordero E. **2003**. Anti-Avian Antibodies and Rheumatoid Factor in Pigeon Hypersensitivity Pneumonitis. Clin Exp Allergy. 33: 226-232.
3. Alberts, Bruce; Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walters. **2002**. Molecular Biology of the Cell; Fourth Edition. New York and London: Garland Science.
4. Alcano, Eduard. DNA technology. **1999**. 2ª edición. Harcourt, U.S.A..
5. Birren B, Ed. **1999**. Genome Analysis. A Laboratory Manual Series, Vol 4. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
6. Bourke S.J., Dalphin J.C., G. Boyd}, McSharry C., Baldwin C.I., Calvert J.E. **2001**. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts. Eur Respir J; 18: 81–92.
7. Brambila-Tapia AJL, Dávalos-Rodríguez IP. **2009**. Polimorfismos de los receptores Fcγ y lupus eritematoso sistémico. Rev Invest Clin; 61: 66-72
8. Carrillo-Rodríguez José G., Sansores Raúl H., Castrejón A, Pérez-Padilla R, Ramírez-Venegas A, Selman M. **2000**. Neumonitis por Hipersensibilidad en la Ciudad de México. Salud Pública Mex., 42: 201-207.

9. Cebollero P, Echechipia S, Echegoyen A, Lorente PM, Fanlo P. **2005**. Neumonitis por hipersensibilidad. *Ansist Sanit Navar*. 28:91-9.
10. Ceppellini R., Siniscalco M., and Smith CAB. **1955**. The estimation of gene frequencies in a random-mating population. *Annals of Human Genetics*, 20:97–115.
11. Chen JY, Wang CM, Tsao KC, Chow YH, Wu JM, Li CL. **2004**. Fcγ receptor IIa, IIIa, and IIIb polymorphisms of systemic lupus erythematosus in Taiwan. *Ann Rheum Dis*; 63: 877-80.
12. Davis LG, Dibner MK, Battey JF. **1986**. *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier.
13. Davis Randall S, Wang Yui-Hsi, Kubagawa H, Cooper Max D. **2001**. Identification of a family of Fc receptor homologs with preferential B cell expression. *PNAS*. 98: 9772–9777.
14. De Haas Masja, Marion K, van Zwieten R, Roos D, and Albert E.G.Kr. Von dem Borne. **1995**. Neutrophil FcγRIIIb Deficiency, Nature, and Clinical Consequences: A Study of 21 Individuals from 14 Families. *Blood*, 86: 2403-2413.
15. Dhanda, J.S.; Shyam S. Chauhan. **2008**. Structural Levels of Nucleic Acids and Sequencing. *Molecular Biology*. 1-30.
16. Erlich, H.A. and N. Arnheim. **1992**. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Ann. Rev. Genet*. 26:479-506.
17. Fromont P, Bettaieb A, Skouri H, Floch C, Poulet E, Duedari N, Bierling P **1992**: Frequency of the polymorphonuclear Fcγ receptor III

deficiency in the French population and its involvement in the development of neonatal alloimmune neutropenia. *Blood*. 79:2131.

18. Gómez-Luis Miguel, Canas and Anaya Juan-Manuel. **2005**. Fcy receptors and autoimmunity. *Acta Med Colomb*, 30: 27-35.
19. Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin and W.M. Gelbart. **1996**. An introduction to genetic analysis (6th Ed.). W.H. Freeman and Co., NY.
20. GRIFFITHS, A.J.F., S. R. WESSLER, R.C. LEWONTIN & S. B. CARROLL. **2008**. Genética. McGraw-Hill Interamericana. Novena edición.
21. Hatta Y, Tsuchiya N, Ohashi J, Matsushita M, Fujiwara K, Hagiwara K, Juji T and Tokunaga K. **1999**. Association of Fc gamma receptor IIIB, but not of Fc gamma receptor IIA and IIIA polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Japanese. *Genes Immun*; 1: 53-60.
22. Hinojosa M. **2000**. Problemas diagnósticos en la neumonitis por hipersensibilidad. *Alergol Inmunol Clin.*; 15:1-15.
23. Juergen Bux, Ernst-Ludwig Stein, Philippe Bierling, Patricia Fromont, Mary Clay, David Stroncek and Sentot Santoso. **1997**. Characterization of a New Alloantigen (SH) on the Human Neutrophil Fcgreceptor IIIb. *Blood*, 89: 1027-1034.
24. López De Roux María del Rosario, Cortina Rosales L, Muñiz Díaz E, Bencomo Hernández A. **2003**. Aloantígenos de granulocitos. Importancia clínica. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 19:2-3.

25. Luque J. Biología Molecular e Ingeniería Genética. **2001**. Universidad de Alcalá. 2:12-13).
26. Malmberg P, Rask-Andersen A, Rosenhall L. **1993**. Exposure to microorganisms associated with allergic alveolitis and febrile reactions to mold dust in farmers. *Chest*; 103:1202-1209.
27. Mejía AM, Estrada GA, Suárez LT, Delfino Alonso Martínez* Navarro M, Gaxiola GM, Barrientos E, Rojas SJ, Carrillo RJ. **2007**. La Linfocitosis En El Lavado Bronquioloalveolar Puede Predecir La Respuesta Al Tratamiento En Pacientes Con Neumonitis Por Hipersensibilidad *rev Inst Nal Enf Resp Mex* 20: 183-188.
28. Mejía Mayra E, Teresa de J Suárez, Arreola Alejandro, Alonso Delfino, Estrada Andrea, Zamora C Ana, Juárez Fortunato, Gaxiola Miguel O, Carrillo Guillermo. **2007**. Neumonitis por hipersensibilidad. *Neumología y Cirugía de Tórax*. 66:115-123,
29. Mora Nancy, Rosales C. **2009**. Funciones de Receptores Fc en mecanismos de defensa y regulación inmunológica. *Rev Invest Clin*; 61 : 313-326.
30. Morgan W Ann, Barrett H Jennifer, Griffiths Bridget, ubramanian Deepak , Robinson I Jim, Keyte H Viki, Ali Manir, Jones A Elizabeth, Old W Robert, Ponchel Frederique, Boylston W Arthur, Situnayake Deva R, Markham F Alexander, Emery Paul and Isaacs D John. **2005**. Analysis of Fcy receptor haplotypes in rheumatoid arthritis: *FCGR3A* remains a major susceptibility gene at this locus, with an additional contribution from *FCGR3B*. *Arthritis Research & Therapy*. 8: 1-9.

31. Nimmerjahn F, Ravetch J. **2005**. Divergent immunoglobulin-G subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 310: 1510-1512.

32. Patel Am, Ryu Jh, Reed Ce. **2001**. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts and future questions. *J Allergy Clin Immunol*; 108: 661-670.

33. Rodrigo-Gómez D, Oteo-Calatayud A, Alonso-Rosado A, Bascones Martínez A. **2008**. El papel de la genética en la aparición y desarrollo de la periodontitis II: Polimorfismos asociados a la enfermedad periodontal. *Av Periodon Implantol*. 20: 121-130.

34. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, et al. **1988** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491.

35. Salmon EJ, Millard SS, Brogle Nina L, Kimberly P Robert. **1995**. Fc gamma receptor IIIb enhances Fc gamma receptor IIa in an oxidant dependent and allele sensitive manner. *J Clin Invest* 95: 2877-85.

36. Sánchez-Rodríguez SH, Barajas-Vásquez GE, Ramírez-Alvarado ED, Moreno-García A, Barbosa-Cisneros OY. **2004**, El fenómeno de autoinmunidad: enfermedades y antígenos relacionados. *Rev Biomed*; 15:49-55.

37. Selman M, Lacasse Y, Pardo A, Cormier Y. **2010**. Hypersensitivity pneumonitis caused by fungi. *Proc Am Thorac Soc*; 7:229-36.

38. Siriboonrit U, Tsuchiya N, Sirikong M, Kyogoku C, Bejrachandra S, Suthipinittharm P. **2003**. Association of Fc gamma receptor IIb and IIIb

polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens*; 61: 374-83.

39. Stark Alan E. **2005**. The Hardy-Weinberg principle, *Genetics and Molecular Biology* , 28: 485-485.
40. Stroncek David, *MD*. **2004**. Neutrophil Antigens and Antibodies. *Scientific communications*. 54-57
41. Takai T. **2005**. Fc Receptors and Their Role In Immune Regulation And Autoimmunity. *Journal of Clinical Immunology*. 25: 1-18.
42. Van der Pol WL, van de Winkel JG. **1998**, IgG receptor polymorphisms: risk factors for disease. *Immunogenetics*; 48: 222–32.
43. Watson J.D. and Crick F.H.C. **1953**. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171: 737–738
44. Woda Bruce A. **2008**. Hypersensitivity Pneumonitis: Immunopathology. *Arch Pathol Lab Med*. 132: 204-205