



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

**ESTUDIO DEL POLIMORFISMO NA2/NA2 DEL
RECEPTOR Fc PARA IgG (Fc γ RIIB) EN PACIENTES CON
NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:
ELIZABETH SANTOS FLORES

DIRECTOR DE TESIS
Q.F.B. MA. MARIANA TÉLLEZ ARAIZA

ASESOR DE TESIS
M. en E. YOLANDA FLORES CABRERA



MÉXICO, D.F., ENERO DE 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.

DEDICATORIAS

PARA TÍ MAMÁ, PORQUE ME DEJASTE LA MEJOR HERENCIA:
MI SUPERACIÓN PERSONAL Y PROFESIONAL.

A MI TÍO FÉLIX ANGELES POR SU APOYO EN LOS MOMENTOS
DIFÍCILES.

PARA LOS DOS, PORQUE A PESAR DE QUE FÍSICAMENTE YA
NO ESTÁN CONMIGO, SIEMPRE SERAN PARTE IMPORTANTE
DE MI VIDA.

TAMBIÉN PARA MI SOBRINA ZOÉ, GRACIAS POR SER UN
GRAN MOTIVO DE ALEGRÍA.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirme terminar este ciclo y por la oportunidad que me brinda cada día.

A mis sinodales: Dr. Rubén Marroquín, Dra. Isabel Soto, Q.F.B. Enrique Escalera, por brindarme su atención, tiempo y aportaciones.

A mis asesoras:

Q.F.B. Mariana Téllez Araiza.

M. en E. Yolanda Flores Cabrera.

por su paciencia, esfuerzo y conocimiento .

Al Dr. Erasmo Martínez Cordero que hizo posible este proyecto.

A Patricia Ramos y Eduardo Flores.

A mi maestra Patricia Vidal.

A mis hermanos: Luis, Ara, Lucero y Carlos.

Para toda mi familia: mi papá, mis primos: Felipe, Flor, Liz, Pepe y mi tía Margarita.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Estructura Pulmonar	3
2.1.1 Mecanismos de defensa del pulmón.....	4
2.2 Enfermedades pulmonares intersticiales difusas	6
2.3 Neumonitis por hipersensibilidad (NH).....	7
2.3.1 Antecedentes históricos de la NH	8
2.3.2 Manifestaciones clínicas.....	9
2.3.3 Epidemiología	9
2.3.4 Antígenos responsables.....	11
2.3.5 Inmunopatología.....	13
2.3.6 Diagnóstico	14
2.3.7 Tratamiento	15
2.4 Receptores para la porción Fc (FcR).....	15
2.5 Receptores Fc gamma (Fc γ R).....	17
2.6 Fc γ RIII (CD16)	19
2.6.1 Fc γ RIIIA	19
2.6.2 Fc γ RIIIB	20
2.7 Isoforma NA1-Fc γ RIIIB y NA2-Fc γ RIIIB	21
2.8 Técnicas de biología molecular para el estudio del polimorfismo NA2/NA2 del gen <i>FcγRIIIB</i>	23
2.8.1 Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN).....	23
2.8.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	24
2.8.2.1 Reactivos necesarios para la PCR.....	25
2.8.3 Electroforesis de ADN.....	27
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28

4. OBJETIVOS	29
4.1 Objetivo general.....	29
4.2 Objetivos Específicos.....	29
5. HIPÓTESIS	30
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	30
6.1 Tipo de estudio.....	30
6.2 Población de estudio.....	30
6.3 Criterios de inclusión y exclusión.....	30
6.3.1 Inclusión.....	30
6.3.2 Exclusión.....	31
6.4 Variables.....	31
6.5 Material y Método.....	31
6.5.1 Obtención de material biológico.....	31
6.5.2 Obtención de ADN genómico.....	31
6.5.3 Determinación de pureza e integridad de ADN.....	32
6.5.4 Detección del polimorfismo.....	32
6.5.5 Gen constitutivo.....	33
6.5.6 Análisis de productos de PCR.....	33
6.6 Diseño estadístico.....	33
6.6.1 Análisis estadístico.....	33
7. RESULTADOS	34
7.1 Determinación de pureza e integridad de ADN.....	34
7.2 Detección del polimorfismo.....	34
7.3 Análisis de productos de PCR.....	37
7.4 Análisis estadístico.....	39
8. DISCUSIÓN	40
9. CONCLUSIONES	42
10. ANEXOS	43

10.1 Reactivos.....	43
10.1.1 Cloruro de sodio (NaCl) 5 Mm	43
10.1.2 Lauril sulfato de sodio al 10% (SDS 10%).....	43
10.1.3 Tris-acetato de sodio-EDTA 10X (TAE 10X)	43
10.1.4 TAE 1X.....	43
10.1.5 Amortiguador de carga para muestra de ADN.....	44
10.1.6 Cromóforo.....	44
10.2 Electroforesis de moléculas de ADN mayores de 100 pb.....	44
11. REFERENCIAS	46

ESTUDIO DEL POLIMORFISMO NA2/NA2 DEL RECEPTOR Fc PARA IgG (FcγRIIIB) EN PACIENTES CON NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD.

RESUMEN

La Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) es una enfermedad pulmonar, producida por antígenos que causan una respuesta inmune exagerada en individuos susceptibles.

Se ha identificado el polimorfismo NA2/NA2 del receptor para la porción Fc de IgG (FcγRIIIB) como un factor de susceptibilidad en enfermedades con un mecanismo de daño similar a la NH, por lo cual se decidió estudiar su posible asociación, pues aún no se había estudiado en población alguna que presentara esta enfermedad. Se estableció la distribución del polimorfismo NA2/NA2 en 30 pacientes con NH del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) de la Ciudad de México en comparación con 30 personas sanas. Para el estudio se obtuvo ácido desoxirribonucleico (ADN) de las muestras y se amplificó la secuencia correspondiente para el polimorfismo del FcγRIIIB (NA2/NA2) por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cualitativa. Los resultados obtenidos para las muestras de ambas poblaciones muestran que los genotipos del polimorfismo se encuentran distribuidos de manera muy similar y el análisis estadístico indica que no hay una relación significativa del polimorfismo NA2/NA2 del receptor FcγRIIIB con la NH, por lo que se concluye que este polimorfismo no está asociado a tal enfermedad.

1. INTRODUCCIÓN

La NH se encuentra clasificada dentro de las enfermedades intersticiales del pulmón, las cuales son el resultado de un amplio espectro de trastornos de los mecanismos de defensa del aparato respiratorio, que afectan difusamente al intersticio pulmonar, teniendo un inicio básicamente inflamatorio que poco a poco se va modificando hasta que predomina finalmente la fibrosis y por lo tanto se afecta de manera importante la función pulmonar.

La NH constituye un tema de interés por ser causa de incapacidad, baja laboral y morbimortalidad, pues a menudo es relacionada con factores ocupacionales; desde el año de 1713 el médico italiano Ramazzani, padre de la medicina laboral, describió los riesgos de salud relacionados con 52 ocupaciones. En el caso de los trabajadores de granos estableció que la exposición crónica a éstos puede causar una insuficiencia respiratoria, con esta observación proporcionó el primer reporte de lo que ahora se conoce como NH o alveolitis alérgica extrínseca, una reacción inflamatoria causada por la inhalación repetida de partículas lo suficientemente pequeñas para llegar al parénquima pulmonar y provocar una respuesta inmune. Actualmente se investigan las causas y factores que intervienen para el desarrollo de esta enfermedad.

Varios estudios han identificado el polimorfismo NA2/NA2 del Receptor para la porción Fc de IgG (FcγRIIIB) como un factor de susceptibilidad en enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y la nefropatía por IgA con un mecanismo de daño similar a la NH. El principal objetivo de este trabajo es establecer la distribución del polimorfismo NA2/NA2 en pacientes con NH en comparación con donadores sanos para determinar si el polimorfismo del FcγRIIIB está asociado a tal enfermedad. Para el estudio se obtuvo ADN de las muestras y se amplificó la secuencia correspondiente para el polimorfismo del FcγRIIIB (NA2/NA2) por medio de la técnica de PCR cualitativa, usando 30 muestras de donadores sin relación con la enfermedad estudiada y 30 pacientes con NH del INER.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Estructura Pulmonar

La estructura de los pulmones está diseñada ingeniosamente para que pueda cumplir con su función principal: el intercambio de los gases entre el aire inspirado y la sangre. Los dos pulmones están alojados en el interior de la cavidad torácica, protegidos por las costillas; presentan un aspecto rosado y esponjoso, son huecos y están cubiertos por una doble membrana lubricada (serosa) llamada pleura, que evita que los pulmones rocen directamente con la pared interna de la caja torácica.¹

Los pulmones contienen: vías aéreas de conducción e intercambio (bronquios, bronquiolos, bronquiolos respiratorios, conductos alveolares, sacos alveolares y alveolos), vasos (la arteria y vena pulmonares y la arteria y vena bronquiales), nervios y tejido conjuntivo de soporte (parénquima pulmonar), con propiedades elásticas.²

Las vías aéreas (los bronquios principalmente, derecho e izquierdo) parten de la tráquea y a continuación se ramifican por dicotomías sucesivas, dando lugar a las vías respiratorias cada vez más pequeñas³ (figura 2.1): los bronquios principales se dividen dentro del pulmón en bronquios secundarios o lobares, los bronquios secundarios se dividen de nuevo en bronquios terciarios o segmentarios, éstos a su vez se siguen dividiendo siempre en dos vías de menor calibre hasta terminar formando los bronquiolos, que a diferencia de los bronquios, carecen de cartílagos y glándulas submucosas en las paredes. Los bronquiolos al seguir ramificándose, dan lugar a los bronquiolos terminales. La parte del pulmón distal al bronquiolo terminal se llama ácino, que se ocupa del intercambio gaseoso; los ácinos contienen los alvéolos, éstos son bolsas aéreas y hay de 150 a 400 millones en cada pulmón. Las paredes de los alvéolos son extremadamente delgadas y la mayor parte del intercambio gaseoso se produce en ellos. Los alvéolos están revestidos por neumocitos de tipos I y II situados sobre una

membrana basal: los neumocitos de tipo I son estructurales, mientras que los de tipo II producen surfactante,^{1,2} sustancia que evita el colapso alvéolar, sirve como antioxidante neutralizando algunos gases contaminantes y atrapa partículas de polvo, facilitando la fagocitosis.³

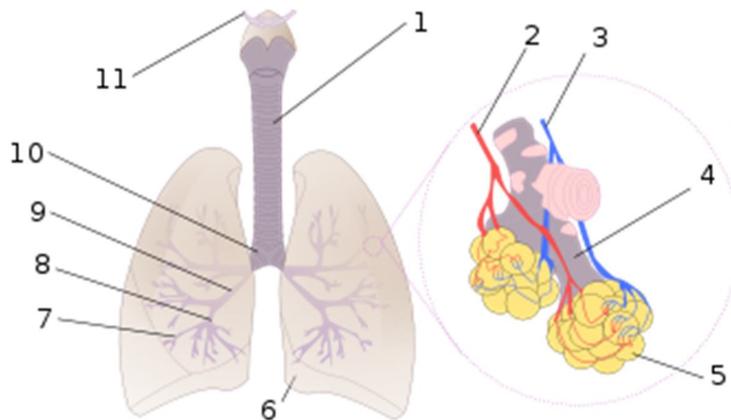


Figura 2.1 Esquema que muestra las divisiones de la vía aérea hasta la unidad respiratoria final. 1.Tráquea; 2. Arteria pulmonar; 3. Vena pulmonar; 4. Bronquiolo terminal; 5. Alvéolos; 6. Corte cardíaco; 7. Bronquios terciarios o segmentados; 8. Bronquios secundarios o lobares; 9. Bronquio principal; 10. Bifurcación traqueal; 11. Laringe.²

2.1.1 Mecanismos de defensa del pulmón

Los pulmones tienen un área de superficie muy amplia para el intercambio gaseoso, de hecho poseen la mayor área de superficie del organismo en contacto con el ambiente, lo que hace que sean extremadamente susceptibles a una lesión, además proporcionan una excelente puerta de entrada para la infección, pues están expuestos a numerosos materiales extraños como partículas de polvo, polen, esporas de hongos, bacterias, virus y contaminantes ambientales; por lo tanto, es necesario que los mecanismos de defensa (cuadro 2.1) prevengan la infección y reduzcan los riesgos de lesión por inhalación de materiales extraños.²

Cuadro 2.1 Descripción de los mecanismos de defensa del pulmón y su función.³⁻⁵

Mecanismo de defensa	Función
Mecanismos de defensa mecánico y aerodinámico	
Caja torácica	Protege a los pulmones y da soporte para que se lleve a cabo la ventilación pulmonar.
Filtros	Elimina del 70 al 80% de las partículas suspendidas en el aire, sobre todo las mayores de 5 µm, las partículas menores se depositan a nivel alveolar.
Reflejo de la tos	Remueve el exceso de secreciones y la presencia de cuerpos extraños, tanto en tráquea como en bronquios mayores.
Mecanismo mucociliar	
Cilios	Movilizan las secreciones y moco producidos en el árbol traqueobronquial en dirección cefálica hasta la tráquea, para que sean expectoradas o deglutidas.
Moco y secreciones	El moco es una glucoproteína que cubre el árbol respiratorio, junto con los cilios, atrapan y eliminan microorganismos y polvo de las vías aéreas superiores.
Mecanismos de defensa bioquímicos	
Inhibidores de proteasas	Grupo de péptidos que se caracterizan por bloquear el sitio catalítico de las enzimas proteolíticas.
Lactoferrina	Enzima producida por las células del epitelio de las glándulas mucoproductoras y por los polimorfonucleares; tiene una potente actividad bacteriostática.
Lisozima	Enzima que se localiza en las células de la serie blanca y tiene una actividad bacteriostática.
Complemento	Las actividades más importantes de complemento a nivel del árbol respiratorio, son la inactivación de virus, opsonización, quimiotaxis de células fagocíticas y lisis de bacterias.
Mecanismo de defensa celulares	
BALT (tejido linfoide asociado a los bronquios)	Se encuentran en las cercanías de las paredes bronquiales y esta recubierto por células M, células epiteliales especializadas que toman muestras del antígeno y las transportan al tejido linfoide.
Macrófago alveolar	Fagocita y destruye las partículas que llegan a este nivel, principalmente las opsonizadas y procesan los antígenos que ingieren para exponerlos a los linfocitos T.

Las vías respiratorias cuentan con un sistema altamente especializado para defenderse de partículas nocivas que inhalamos del medio ambiente durante el proceso de la respiración, la inhalación de estas partículas puede ser tolerable comúnmente, pero cuando las concentraciones son elevadas (ej. exposición laboral) o hay existencia de factores como la susceptibilidad genética, condiciones ambientales e infecciones, las partículas dañan el aparato respiratorio, produciendo enfermedad.³

2.2 Enfermedades pulmonares intersticiales difusas

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) representan un grupo amplio y heterogéneo de padecimientos no neoplásicos ni infecciosos que afectan al parénquima pulmonar con grados variables de inflamación y fibrosis. Muchas de estas enfermedades tienen un componente intra-alveolar además del intersticial y es frecuente que se superpongan las manifestaciones histológicas de procesos que son diferentes, sin embargo, la semejanza de los síntomas, signos clínicos, los datos radiológicos y las alteraciones fisiopatológicas justifica que se estudien conjuntamente; estos procesos representan el 15% de las enfermedades no infecciosas.³

Los pulmones contienen diminutos sacos de aire (alvéolos), que es donde se absorbe el oxígeno, estos sacos de aire se abren o expanden con cada respiración; el tejido alrededor de estos sacos de aire se denomina intersticio, en personas con enfermedad pulmonar intersticial, este tejido se vuelve rígido o cicatrizado y los sacos de aire no pueden expandirse tanto, como resultado no mucho oxígeno puede ingresar a los pulmones y por lo tanto al cuerpo. Las EPID se caracterizan por la afectación difusa y habitualmente crónica del tejido conjuntivo del pulmón, sobre todo del intersticio más periférico y más delicado de las paredes alveolares. El intersticio está formado por la membrana basal de las

células endoteliales y epiteliales, fibras colágenas, tejido elástico, proteoglucanos, fibroblastos, mastocitos y en algunas ocasiones por linfocitos y monocitos.¹ En relación con su etiología, las EPID se dividen en tres grandes grupos que nacen en el consenso de la American Thoracic Society (ATS) y la European Respiratory Society (cuadro 2.2).

Cuadro 2.2 Clasificación de las EPID.^{6, 7}

Neumonías intersticiales idiopáticas	De causa conocida o asociadas	Primarias o asociadas a otras enfermedades no bien definidas
Fibrosis pulmonar idiopática	Neumoconiosis	Sarcoidosis
Neumonía intersticial aguda	Neumonitis por hipersensibilidad (alveolitis alérgica extrínseca)	Microlitiasis alveolar
Neumonía intersticial no específica	Inducidas por fármacos y radioterapia	Linfangioleiomiomatosis
Bronquiolitis respiratoria / enfermedad pulmonar intersticial difusa	Asociadas a enfermedades del colágeno	Eosinofilia pulmonares
Neumonía intersticial descamativa	Asociadas a enfermedades hereditarias	Histiocitosis X (granulomatosis de células de Langerhans)
Neumonía organizada criptogénica	Hiper calciuria hiper calcémica	Amiloidosis
Neumonía intersticial linfocítica	Neurofibromatosis	
	Síndrome de Hermansky Pudlak	
	Asociadas a enfermedades inflamatorias del intestino	

2.3 Neumonitis por hipersensibilidad (NH)

La NH es una enfermedad pulmonar, producida por una respuesta inmune exagerada, causada por inhalación de una gran variedad de antígenos, presentando inflamación de las paredes alveolares y provocando una reacción inmunopatológica del pulmón en individuos susceptibles.⁹⁻¹² Lo que determina la

susceptibilidad no está claramente definido, sin embargo, hay evidencias de que la susceptibilidad genética es importante pues de acuerdo a investigaciones actuales, los individuos con una respuesta TH1 dominante es más probable que desarrollen la enfermedad clínica¹³ y los polimorfismos en el complejo mayor de histocompatibilidad, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y los inhibidores tisulares de metaloproteinasa-3 (TIMP-3) están asociados al desarrollo o resistencia de la enfermedad.^{14,15}

2.3.1 Antecedentes históricos de la NH

El hombre ha estado siempre expuesto a sustancias capaces de causar enfermedad respiratoria y su posible relación con diversos oficios es conocida desde Hipócrates (siglo V a.C.), pero es Ramazzini da Capri quien en 1713 da las primeras descripciones de la NH, en el libro *De Morbis Artificum Diatriba*, uno de los más importantes tratados de medicina ocupacional de la época. Más de 200 años después, en 1930 Campbell presentó en detalle el primer informe de NH, donde describe el cuadro clínico y la relación de la enfermedad con los granjeros expuestos a partículas de hongos del heno. Pocos años más tarde, Pickles acuña el término "pulmón del granjero"; la bagasosis fue descrita en 1941 por Jamison y Hopkins y en 1960, la enfermedad de los criadores de pájaros, por Pearsall, Plessner y cols. En 1970, Banaszak y cols. describen la relación de la NH con los individuos expuestos en su oficina de trabajo al *Thermophilic actinomycete* contaminando el aire acondicionado. Durante los últimos 30 años se ha descrito un número importante de agentes etiológicos y fuentes de antígenos capaces de inducir la enfermedad.⁸

2.3.2 Manifestaciones clínicas

La manifestación clínica de la NH clásicamente se ha dividido como aguda, subaguda y crónica (cuadro 2.3) dependiendo de la frecuencia, tiempo de exposición al agente causal y la duración de la enfermedad.¹⁶ La forma aguda se considera de buen pronóstico, no así la forma subaguda y crónica, que tienen mal pronóstico por evolucionar a fibrosis pulmonar, con mortalidad de 29% en un promedio de cinco años.¹⁰ La clasificación más reciente de la enfermedad es propuesta por Selman, que divide la enfermedad en activa no progresiva e intermitente, aguda progresiva intermitente y crónica progresiva como no progresiva.¹⁷

Cuadro 2.3 Manifestaciones clínicas de la NH.¹⁶

FORMA AGUDA	FORMA SUBAGUDA	FORMA CRÓNICA
Exposición a elevadas concentraciones del Ag.	Exposición continua o discontinua al Ag pero a concentraciones bajas	Igual que en la forma subaguda
Síntomas: episodios pseudogripales, artralgias, mialgias, tos seca, disnea, fiebre, escalofrío, dolor torácico. Los síntomas se producen de 4 a 8 h después de la exposición al Ag.	Síntomas: malestar general, astenia, pérdida de peso, tos seca o productiva, disnea de moderada a severa.	Representa las secuelas de las formas anteriores: acropaquia, hipertensión pulmonar, fibrosis pulmonar difusa y muerte por fallo respiratorio.

2.3.3 Epidemiología

En México, la NH frecuentemente es inducida por el antígeno aviario y se presenta principalmente en mujeres, se calcula que afecta a menos del 7% de los sujetos expuestos a los antígenos causales, sin embargo la mortalidad es cercana al 30%.¹⁰

En la Ciudad de México, las delegaciones Iztacalco, Venustiano Carranza, Cuauhtémoc, Iztapalapa e incluso las zonas conurbadas del Estado de México (Figura 2.2) están asociados a la NH. 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.¹⁸

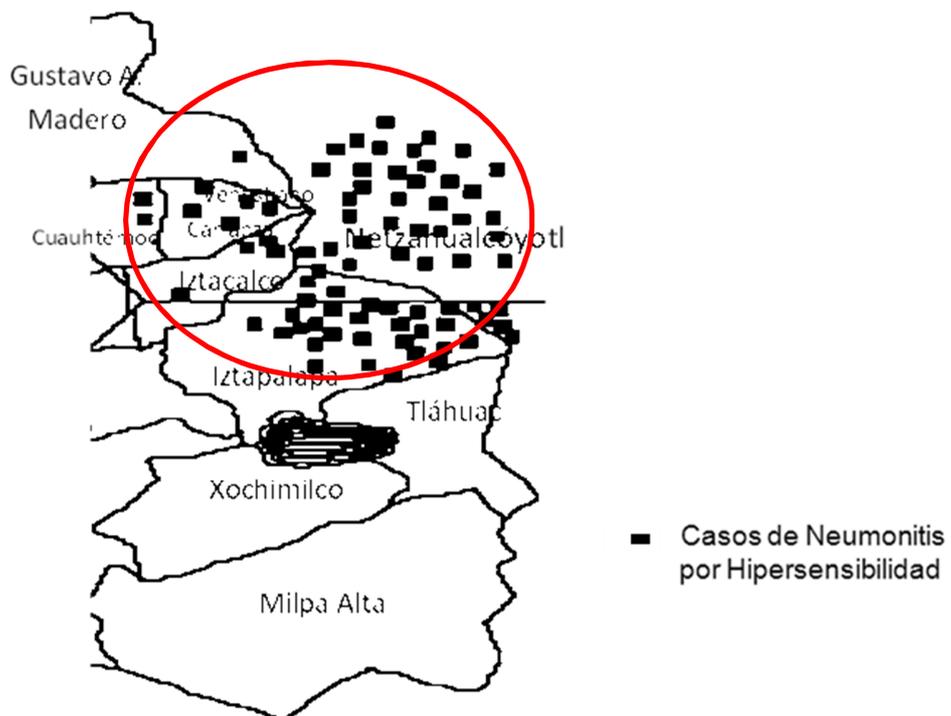


FIGURA 2.2. Sitios de afluencia de los pacientes con NH en la Ciudad de México y zona conurbada (Estado de México), INER, 1999.¹⁰

2.3.4 Antígenos responsables

La NH es una enfermedad inflamatoria crónica causada por antígenos inhalados que inducen el desarrollo de una respuesta inflamatoria linfocitaria en las vías aéreas periféricas e intersticio circundante. No todos los antígenos inhalados tienen capacidad para desencadenar la enfermedad, aquellos que inducen NH tienen características que los diferencian de los capaces de inducir otras enfermedades, como su tamaño de 0.5 a 3 μm de diámetro para alcanzar el alvéolo, a diferencia de los antígenos causantes de asma, que son mayores (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, contribuyendo al aumento de la permeabilidad capilar y a la migración quimiotáctica de los neutrófilos a los pulmones; estimulan a los macrófagos alveolares (ej. glucano de la pared celular de hongos) y a la respuesta celular tardía; por último, suelen ser resistentes a la degradación enzimática como la mucina intestinal de la paloma, glucoproteína de alto peso molecular conformada por un 70 a 80% de hidratos de carbono. Además del antígeno en sí mismo, el grado de exposición también es un factor importante en el desarrollo de la enfermedad.¹⁹

Los antígenos capaces de inducir NH son moléculas de alto peso molecular procedentes de microorganismos, tanto bacterias como hongos, así como proteínas derivadas de animales, aunque también se ha podido demostrar la enfermedad por moléculas de bajo peso molecular como isocianatos⁷ (cuadro 2.4). Los antígenos más frecuentes que causan NH en todo el mundo son las proteínas de pájaro (enfermedad de los criadores de aves) y la bacteria *Saccharopolyspora rectivirgula*, sin embargo, los hongos también están implicados en muchos casos, incluyendo actividades ocupacionales y no ocupacionales.¹¹

Cuadro 2.4 Antígenos causales de NH.^{3,7}

Antígeno	Origen	Enfermedad
Bacterias		
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	Heno enmohecido	Pulmón del granjero
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	Caña de azúcar	Bagazosis
<i>Thermoactinomyces sacchari</i>	Humidificadores	Neumonitis por sistemas de aire acondicionado
<i>Trichomycterus candidus</i> , <i>T. viridis</i>	Base cultivo setas	Pulmón del cultivador de setas
<i>Bacillus cereus</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	Humidificadores	Enfermedad de los humidificadores
<i>Bacillus subtilis</i>	Detergentes	Trabajadores de fábricas de detergentes
Hongos		
<i>Aspergillus sp.</i>	Malta enmohecida	Pulmón del trabajador de malta
<i>Alteraria sp.</i>	Madera enmohecida	Pulmón del carpintero
<i>Penicillium frequetans</i>	Corcho enmohecido	Suberosis
<i>Penicillium caseii</i> y <i>P. roqueforti</i>	Queso	Pulmón del trabajador de quesos
<i>Pullularia sp.</i>	Madera mohosa	Secuoiosis
<i>Trichoporon cutaneum</i>	Polvo doméstico	Neumonitis tipo estival
Proteínas animales		
Proteínas de aves	Excretas y plumas de aves: palomas, pichones, pericos y canarios.	Pulmón del criador de aves
Proteínas bovinas y porcinas	Extractos de hipófisis	Pulmón del inhalador de hipófisis
Proteínas de la orina	Orina de rata	Pulmón del técnico de laboratorio
<i>Psitophylus granarius</i>	Gorgojo del trigo	Pulmón de los molineros
Productos químicos		
Anhídrido trimelítico, isocianatos	Espumas de poliuretano, pinturas para rociar, gomas especiales.	Pulmón del trabajador de plásticos
Anhídrido ftálico	Resinas epóxido calientes	Pulmón de resinas
Piretro	Insecticidas	Pulmón del piretro

2.3.5 Inmunopatología

La inmunopatología de la NH es compleja y los mecanismos concretos no han sido suficientemente aclarados, al menos dos mecanismos inmunológicos parecen involucrados: la respuesta de hipersensibilidad tipo III (inmunocomplejos) y la hipersensibilidad tipo IV (hipersensibilidad celular tardía). Se cree que los complejos inmunes están involucrados en el daño tisular precoz mediante la activación de los neutrófilos por la activación del complemento y de los macrófagos, la evidencia apunta a que el macrófago alveolar es el coordinador en el desarrollo de la NH. Después de inhalar el antígeno los macrófagos alveolares se activan y segregan concentraciones elevadas de factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1), proteína 1- α inflamatoria del macrófago e IL-8; asimismo, poseen mayor capacidad presentadora de antígeno y atraen a las células inflamatorias al área, el incremento de macrófagos activados se acompaña de neutrofilia. La hipersensibilidad celular mediada por linfocitos T es probablemente el mecanismo inmunopatogénico mayor, está determinado por la presencia de células T reactivas al antígeno en el pulmón y en la sangre, los hallazgos histológicos muestran los granulomas típicos de la hipersensibilidad mediada por células.^{7,20}

El estudio inmunológico ha permitido demostrar la presencia de distintas alteraciones tanto humorales como en la respuesta celular, entre ellas destacan la aparición de anticuerpos contra el agente causal, complejos inmunes circulantes (CIC), activación de complemento y el incremento de otras inmunoglobulinas incluyendo anticuerpos contra péptidos pulmonares y factor reumatoide,²¹⁻²³ que pueden tener trascendencia clínica y patogénica. En estudios anteriores se observa que el factor reumatoide y los anticuerpos contra el agente causal ocurren frecuentemente en NH respecto a los controles sanos y se ha propuesto que estas anomalías serológicas pueden ser de utilidad en el diagnóstico diferencial al considerar distintas patologías intersticiales pulmonares; además, se ha sugerido que estos anticuerpos pueden tener un papel fisiopatogénico.²⁴⁻²⁶

Entre las causas que pueden explicar la formación de complejos inmunes y su relación con el factor reumatoide 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) o las células B productoras de factor reumatoide^{25,27} mediante su unión a distintos receptores Fc para IgG en estas estirpes celulares. Además, el factor reumatoide de clase IgM, IgG ó IgA activa el sistema de complemento y algunas datos indican que puede modificar sustancialmente a los complejos inmunes circulantes, uniéndose a ellos o cambiando sus características fisicoquímicas y con ello sus efectos biológicos,^{25,28} así como su interacción con los FcγR. A este respecto, la positividad del factor reumatoide en cortes de pulmón²⁹ ha sugerido que puede ocasionar un daño directo en el pulmón y es posible que el factor reumatoide pueda promover el depósito de complejos inmunes, o bien que la reacción cruzada con antígenos propios pueda favorecer un mecanismo de autorreactividad e inducir la lesión tisular.³⁰

2.3.6 Diagnóstico

No existe una prueba que por sí sola permita el diagnóstico, por lo que se requiere una historia cuidadosa y detallada que incluya el estado social, ambiental y ocupacional, así como el cuadro clínico, radiografías, tomografías; pruebas funcionales respiratorias, presencia de anticuerpos específicos circulantes (determinación por medio de la técnica de difusión doble o contrainmunolectroforesis) y la demostración de una enfermedad intersticial. La biopsia pulmonar y el lavado broncoalveolar se consideran útiles para apoyar el diagnóstico.^{10,12}

Cuando se demuestra la exposición clara a un antígeno, la presencia de anticuerpos circulantes contra antígeno, una tomografía donde se observen imágenes en vidrio despolido (característica típica de la NH) y más del 50% de

linfocitos en el lavado broncoalveolar, el diagnóstico de NH es altamente probable; si existen dudas se deben realizar estudios adicionales, entre los que destaca la biopsia pulmonar, donde se podrá demostrar en la mayoría de los casos, una lesión de predominio bronquiocéntrica con neumonitis intersticial difusa, granulomas probablemente formados y/o células multinucleadas.³

2.3.7 Tratamiento

Una vez identificado el antígeno debe evitarse la exposición. El tratamiento farmacológico está encaminado a controlar la inflamación, los mejores antiinflamatorios son los corticoides orales, que actúan por diferentes mecanismos sobre las células inflamatorias y del sistema inmune, disminuyendo su actividad sobre la permeabilidad vascular y sobre la producción de proteínas por el fibroblasto. Se inicia con un tratamiento a base de prednisona con dosis única matutina de 0.5-1 mg/kg de peso (máximo 60 mg). Se mantiene 1-2 semanas y se baja progresivamente en las siguientes 2-4 semanas.⁹

2.4 Receptores para la porción Fc (FcR)

Los receptores Fc pertenecen a una familia heterogénea de glicoproteínas que se expresan en la superficie de las células hematopoyéticas (ver cuadro 2.5) y proporcionan la conexión entre la inmunidad humoral y celular, ayudando en el reconocimiento y la eliminación de los patógenos invasores. Los receptores Fc se unen a la porción Fc (fracción cristalizable) de las inmunoglobulinas, desencadenando cambios conformacionales y por lo tanto la activación de la respuesta inmune efectora, como la fagocitosis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, liberación de citocinas y la presentación de antígenos.³¹⁻³⁴

Los FcR se unen a los diferentes isotipos de las inmunoglobulinas, dependiendo del isotipo al que se una el receptor Fc se le asigna la letra del alfabeto griego que corresponde a ese isotipo, así: Fc γ R, receptor para IgG; Fc α R, receptor para IgA; Fc δ R, receptor para IgD; Fc ϵ R, receptor para IgE y Fc μ R, receptor para IgM,³⁵ de estos receptores, los más estudiados son Fc γ R, Fc α R y Fc ϵ R (cuadro 2.5).

Cuadro 2.5 Principales receptores Fc y sus características.^{34,36}

RECEPTOR	Expresión celular	Efecto de la unión
FcγR	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas Plaquetas Células B, Mastocitos Células de Langerhans	Captación de antígenos Activación de estallido respiratorio Liberación de gránulos(eosinófilos) Inducción de muerte celular
FcϵR	Mastocitos, Eosinófilos Basófilos Células Dendríticas foliculares	Secreción de gránulos
FcαR	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Captación de antígenos Inducción de muerte celular

Los receptores Fc son clasificados también por la afinidad con la que la inmunoglobulina se une al receptor, por lo tanto, existen receptores de alta afinidad y de baja afinidad. Los de alta afinidad se denominan FcRI, poseen un tercer dominio en la porción extracelular que le confiere la alta afinidad y sólo estos receptores tiene la capacidad de unirse a inmunoglobulinas en un grado significativo a las concentraciones que se encuentran normalmente en la sangre; las células que expresan estos receptores pueden adsorber inmunoglobulinas circulantes en sus superficies donde actúan como receptor de antígenos, por

ejemplo, el enlace de moléculas de IgG sin ligando a receptores Fc γ RI en macrófagos o células asesinas naturales actúa armando a estas células para realizar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Los receptores de baja afinidad (FcRII y FcRIII) sólo poseen dos dominios extracelulares que se unen a inmunoglobulinas que interactúan con antígenos multivalentes. Las interacciones de este tipo tienen la responsabilidad de facilitar la fagocitosis a través de la opsonización y también son importantes para desencadenar quimiotaxia y degranulación en neutrófilos y otros fagocitos. En el humano a los FcR se les ha asignado un número CD (Cluster of differentiation) y son usados como marcadores fenotípicos de poblaciones celulares, los genes que codifican para estos receptores se denominan igual que su producto, pero su escritura se hace con letras itálicas.^{35,37}

2.5 Receptores Fc gamma (Fc γ R)

Hay receptores Fc para cada clase de inmunoglobulina (Ig), los más importantes para la fagocitosis de las partículas opsonizadas son los receptores para las cadenas pesadas de los anticuerpos IgG, los denominados Fc γ R.³⁴ Los anticuerpos IgG, las inmunoglobulinas séricas más abundantes, están en su mayoría involucrados en la respuesta inmune secundaria y se produce en mayores cantidades tras una inflamación crónica y en enfermedades autoinmunes. Por lo tanto, se cree que los Fc γ R juegan un papel crucial en la inmunidad, así como en la patogénesis de algunas enfermedades mediadas por complejos inmunes.³³

Los Fc γ R se expresan en diferentes tipos de células, presentan distinta afinidad a la IgG y tienen diversos grados de polimorfismo (Cuadro 2.6).

Cuadro 2.6 Características de los receptores Fc γ R.³⁸

NOMBRE	CD	AFINIDAD	EXPRESIÓN CELULAR	MOTIVO	PM(KDa)	POLIMORFISMO
						GENÉTICO
Fc γ RI	64	Alta	MO,DC,E,N	ITAM	72	Conservado
Fc γ RIIA	32	Baja	MO,DC,E,N,P	ITAM	40	H131R
Fc γ RIIB	32	Baja	LB,MA,B.MO,E,N,DC	ITIM	40	I232T
Fc γ RIIIA	16	Baja	MO,NK,MA,E,DC	ITAM	50-80	F158V
Fc γ RIIIB	16	Baja	N,E	-	50-80	NA1-NA2

Abreviaciones: MO: Macrófago/monocito ; DC: Célula dendrítica ; E: Eosinófilo ; N: Neutrófilo; B: Basófilo; LB: linfocito B; NK: Célula asesina natural; MA: Mastocito; P: plaqueta; PM: peso molecular; ITAM: motivo de activación basado en tirosinas; ITIM: motivo de inhibición basado en tirosinas; CD: cluster of differentiation ; H: histidina; R: arginina; I: isoleucina; T: treonina; F: fenilalanina; V: valina; NA1: antígeno neutrofilico1; NA2: antígeno neutrofilico 2.

En los seres humanos se han definido tres clases del receptor de superficie celular para la IgG: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16), cada receptor contiene una cadena polipeptídica de unión al Fc, denominada cadena α que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas; se une al ligando y su porción extracelular se compone de 2 o 3 dominios tipo inmunoglobulina; las diferencias en las especificidades o afinidades de cada FcR por los diferentes isotipos de IgG se basan en las diferencias estructurales de estas cadenas.

Además de la cadena α , los Fc γ R están compuestos por cadenas accesorias (γ , ξ , β), que influyen sobre la respuesta inmunológica, debido que pueden tener funciones de activación o de inhibición dependiendo del tipo de dominio ITAM (motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina) o ITIM (motivos de inhibición del inmunorreceptor basados en tirosina) que posean, ya sea en su cadena α o en sus cadenas accesorias^{34,39-41} (Figura 2.3).

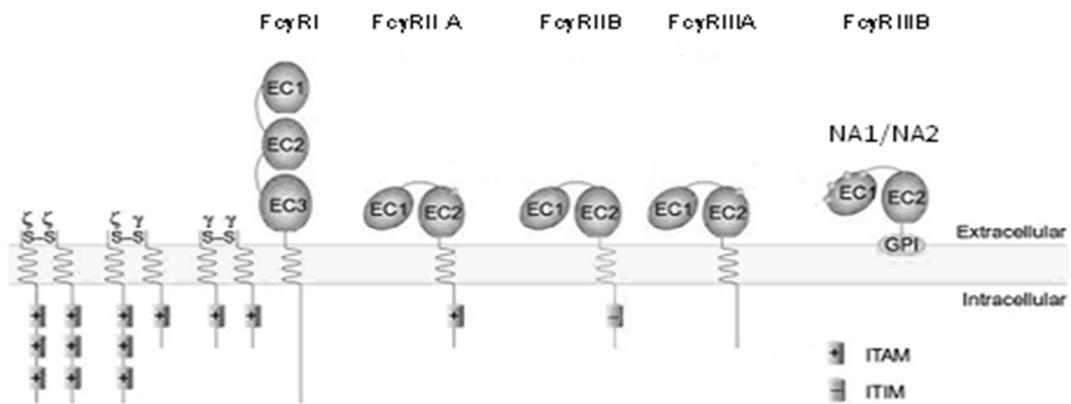


Figura 2.3 Estructura básica de los Fc γ R y sus cadenas accesorias. La activación o inhibición de receptores Fc depende de la presencia de ITAM o ITIM respectivamente, ya sea de manera intrínseca en el receptor (Fc γ RIIA y Fc γ RIIB) o como parte de una cadena accesoria γ o ξ (Fc γ RI y Fc γ RIIA). La excepción es el Fc γ RIIB, que no posee porción citoplasmática, por lo que se encuentra unido a la membrana celular por la molécula GPI. **Abreviaciones:** EC: dominio extracelular; ITAM: motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina, ITIM: Motivos de inhibición del inmunorreceptor basados en tirosina, GPI: glicosilfosfatidilinositol.³⁵

2.6 Fc γ RIII (CD16)

Los Fc γ RIII están formados por 2 genes (*IIIA* y *B*) los cuales producen los transcritos correspondientes Fc γ RIIIA y Fc γ RIIIB que son estructural y funcionalmente diferentes, están muy glicosilados y tiene distribuciones celulares diferentes.^{34,40}

2.6.1 Fc γ RIIIA. Es una proteína transmembrana, se expresa en los monocitos, los macrófagos, las células NK y algunas células T; sus cadenas alfa tienen una afinidad moderada por la IgG y dependiendo de la célula en que se expresen, pueden asociarse a las cadenas de señalización γ/ξ y/o β que tienen dominios ITAM.³⁴ El Fc γ RIIIA participa en la citotoxicidad mediada por células dependientes

de anticuerpo (ADCC) por las células NK y en la eliminación de los complejos inmunes de la circulación por los macrófagos.⁴²

2.6.2 FcγRIIIB. Participa en la fagocitosis y tiene una baja afinidad por la IgG.³⁹ El gen de la isoforma FcγRIIIB está localizado en el brazo largo del cromosoma 1 q23, la caracterización bioquímica ha identificado el FcγRIIIB como una glicoproteína ampliamente glicosilada unida a glicosilfosfatidilinositol (GPI) que se expresa selectivamente en los neutrófilos y tiene dos regiones extracelulares (figura 2.4), compuestas por puentes disulfuro.⁴³⁻⁴⁵ El dominio extracelular 2 de FcγRIIIB presenta un polimorfismo denominado NA (antígeno neutrofílico: neutrophil antigen) que consiste en la sustitución de cuatro aminoácidos, ocasionando un cambio en el patrón de glicosilación de estas moléculas. El polimorfismo NA tiene dos formas alélicas comunes denominadas NA1 y NA2,⁴⁶ así las variantes alélicas son denominadas NA1 en el caso de ser el genotipo sin la sustitución y NA2 para la sustitución.⁴⁷

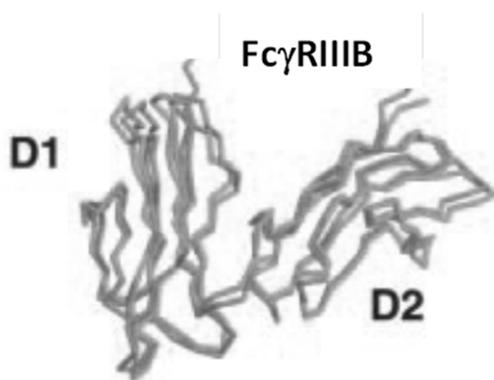


Figura 2.4 Estructura del FcγRIIIB en estado no acomplexado. D1, dominio extracelular distal a la membrana; D2, dominio proximal a la membrana. El sitio de unión al Fc está presente en la parte superior de D2.⁴⁸

2.7 Isoforma NA1-FcγRIIIB y NA2-FcγRIIIB

Las isoformas NA del FcγRIIIB difieren en su peso molecular relativo: 50 a 65 kD para NA1-FcγRIIIB frente a 65-80 kD para NA2-FcγRIIIB, los pesos moleculares diferentes se han atribuido a distintos patrones de glicosilación ocasionadas por el polimorfismo NA.^{47,49,50}

A nivel de ADN, los alelos NA1 y NA2 difieren en cinco nucleótidos, uno de los cuales es una mutación silenciosa^{50,51} (Cuadro 2.7). Aproximadamente el 0,1% de la población europea no expresa la FcγRIIIB en sus neutrófilos, y como consecuencia no presentan los antígenos NA1 y NA2. Este fenotipo se llama NA-nulo y es causada por una deficiencia genética del *FcγRIIIB*.⁵²⁻⁵³

Cuadro 2.7 Diferencias a nivel ADN y proteínas de las isoformas NA2-FcγRIIIA y NA2-FcγRIIIB.⁵⁴

		FcγRIIIB									
		ADN					AMINOÁCIDO				
Posición		141	147	227	277	349	36	38	65	82	106
Forma											
NA1		G	C	A	G	G	Arg	Leu	Asn	Asp	Val
NA2		C	T	G	A	A	Ser	Leu	Ser	Asn	Ile

Abreviaciones: G: Guanina ; C: Citocina; T: Timina; A: Adenina; Arg: arginina; Leu: leucina; Asn: asparragina ; Asp: aspártico; Val: valina; Ser: serina; Ile: isoleucina.

El alotipo NA1 participa en la fagocitosis de partículas opsonizadas por IgG1 e IgG3, e interacciona con mayor eficiencia con complejos inmunes

constituidos por IgG3 que el alotipo Fc γ RIIIB-NA2,⁴⁷ por lo que se ha sugerido que los individuos NA1 tienen mayor capacidad fagocítica que los portadores del alotipo NA2.^{55,56} Los neutrófilos de individuos homocigotos para la forma NA2 unen IgG3 con menor eficiencia y presentan niveles menores de fagocitosis de eritrocitos sensibilizados con anticuerpos monoclonales de isotipo IgG1 e IgG3 dirigidos contra el antígeno Rh. Además, la fagocitosis de bacterias opsonizadas con IgG1 por parte de neutrófilos que expresan NA2 está reducida en comparación con los neutrófilos que expresan la isoforma NA1.³⁵

Debido a que el Fc γ RIIIB tiene gran importancia en distintos mecanismos relacionados con la fagocitosis y en la eliminación de complejos inmunes, diferentes investigadores han estudiado si 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 complejos inmunes, como la glomerulonefritis secundaria a lupus eritematoso ó nefropatía por IgA. Por lo tanto, se propone explorar los polimorfismos de este receptor en la NH, que presenta una sobreactivación de células B con diferentes trastornos humorales incluyendo la formación de complejos inmunes circulantes.

2.8 Técnicas de biología molecular para el estudio del polimorfismo NA2/NA2 del gen *FcγRIIB*.

2.8.1 Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN)

Las muestras de sangre periférica son las más empleadas para la extracción de ADN, comúnmente se extrae sangre venosa recogida con anticoagulante, utilizando la fracción celular total o sus distintos tipos. Para la obtención del ADN de sangre periférica es necesario lisar primero las células con soluciones isotónicas y detergentes como lauril sulfato de sodio (SDS), una vez lisadas las células se procede a la eliminación de proteínas de la muestra utilizando solventes orgánicos como fenol-cloroformo o alcohol isoamílico- cloroformo para prevenir la producción de espuma y facilitar la separación de la fase acuosa y orgánica; las proteínas quedan en la interfase y el ADN en la fase acuosa. Después de extraído el ADN, se precipita con alcohol absoluto o isopropanolol, aunque es más recomendable hacerlo con etanol por ser más volátil y más fácil de eliminar de la muestra. Posteriormente, se centrifuga la muestra y se resuspende en el amortiguador elegido para ser cuantificado; para conocer la concentración de ADN extraído, se utiliza un espectrofotómetro de luz ultravioleta a una longitud de onda de 260 y 280 nm: la lectura de 260 nm permitirá conocer la concentración de la muestra, mientras que la relación de las lecturas de 260/280 nm permitirá conocer la pureza del ADN. Una densidad óptica a 260 nm = 50 µg/mL de ADN de doble cadena, las preparaciones puras de ADN tienen un valor de la relación 260/280 cercano a 1.8.⁵⁷

2.8.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El principio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction) fue reportado por primera vez en 1983 por Kary B. Mullis de Cetus Corporation, pero hasta 1989 se implementó con el descubrimiento de la enzima polimerasa termoestable *Taq* DNA polimerasa extraída de una archae *Thermus aquaticus*. La PCR es un método de biología molecular sensible, rápido y específico para generar múltiples copias de un fragmento de ADN a partir de una molécula molde conocida como templado.⁵⁸

La PCR se desarrolla por medio de un método enzimático *in vitro*, basado en el conocimiento de la secuencia de las regiones adyacentes al fragmento de ADN de interés, partiendo de este conocimiento es posible sintetizar dos oligonucleótidos o iniciadores (primers), complementarios a cada una de las cadenas del templado de ADN que se ubican en las regiones flanqueantes. La PCR se inicia una vez que el ADN de doble cadena se ha desnaturalizado, para permitir a los iniciadores hibridarse con cada una de las cadenas del ADN molde, este paso es seguido por una reacción enzimática de extensión, en la cual la enzima *Taq* DNA polimerasa permite adicionar nucleótidos complementarios a la cadena molde a partir del extremo 5' de cada uno de los iniciadores, generando dos nuevas moléculas de ADN de doble cadena; cada ciclo de PCR está compuesto por diferentes pasos, desarrollados de igual forma a diferente temperatura:^{59,60}

1. Desnaturalización del ADN de doble cadena por calentamiento a una temperatura entre 94-98° C, la cual crea dos cadenas individuales del ADN blanco por la ruptura de los puentes de hidrógeno, exponiendo las bases nitrogenadas.
2. Hibridación de los iniciadores (ADN sintético de hebra sencilla) específicos a la secuencia flanqueante de las cadenas desnaturalizados del ADN blanco, el cual ocurre a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADN; esta

temperatura depende de la temperatura de fusión (T_m) de los iniciadores, la cual puede calcularse mediante una fórmula, aunque generalmente oscila entre 50 y 72° C.

3. Extensión de los iniciadores a 72° C por medio de la enzima *Taq* DNA polimerasa utilizando los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde. Este paso debe desarrollarse durante un tiempo suficiente para generar un producto de ADN que puede exceder incluso los 1.000 pb y teniendo en cuenta la velocidad de acción de la enzima.

Los cambios de temperatura durante la PCR son generalmente controlados utilizando un equipo conocido con el nombre de termociclador, el cual consiste en un bloque incubador que permite programar y regular variadas temperaturas y tiempos para cada uno de los ciclos de la PCR durante todo el proceso.⁵⁹

2.8.2.1 Reactivos necesarios para la PCR:

La reacción de PCR requiere el ADN que contiene la secuencia a amplificar (molde), la enzima *Taq* DNA polimerasa, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) en cantidades suficientes, tampón de reacción para la polimerasa, adicionalmente la mezcla debe tener cloruro de magnesio ($MgCl_2$), los oligonucleótidos específicos y agua libre de DNAsas para completar el volumen final de reacción, el cual oscila entre 20 y 100 μ L (cuadro 2.8).

Cuadro 2.8 Reactivos necesarios para la técnica de PCR.⁶⁰

REACTIVO	CARACTERÍSTICAS
ADN molde	Puede ser de un mínimo de 20 ng cuando se utiliza ADN genómico proveniente generalmente de células eucariotas.
<i>Taq</i> DNA polimerasa	Esta enzima es extraída de la bacteria <i>Thermophylus aquaticus</i> que vive en aguas termales y cuya ADN polimerasa es capaz de trabajar a temperaturas superiores a los 70° C e incluso es estable a 94° C, su fidelidad depende de la concentración del ión Mg^{+2} y de los dNTPs.

Continuación

dNTPs	Variaciones en su concentración afecta la especificidad y fidelidad de la reacción, a concentraciones elevadas disminuyen la fidelidad con la que la polimerasa efectúa su trabajo e incluso se puede inhibir su actividad. También el uso de concentraciones no equitativas de los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) afecta la fidelidad de la reacción, siendo las concentraciones usuales entre 0.2 a 1 mM.
Solución amortiguadora	Está conformada por TRIS- HCl , NaCl, K ⁺ y Mg ²⁺ y albúmina sérica bovina.
Magnesio	Cofactor para la correcta activación y polimerización de la enzima, se requiere a una concentración entre 0.5 y 2.5 mM, la cual debe optimizarse, pues las concentraciones insuficientes de Mg ²⁺ provocan un bajo rendimiento, mientras que en exceso se producen amplificaciones inespecíficas.
Cebadores o iniciadores (PRIMERS)	Se diseñan para ser exactamente complementarios al molde de ADN, su longitud suele estar entre 18 y 25 nucleótidos y su contenido en G + C entre 40 y 75%. La concentración para PCR está entre 0.1- 0.5 nM.
Agua	Se usa como solvente y se requiere libre de DNAsa y RNAsas.

Durante el primer ciclo de una PCR, el producto que se da por la extensión del par de iniciadores, se convertirá en la nueva secuencia molde para el siguiente ciclo. Los ciclos sucesivos generaran un crecimiento exponencial del número de fragmentos de ADN de interés. Luego de terminados los ciclos, el producto de PCR será suficiente para ser visualizado mediante electroforesis en un gel de agarosa o poliacrilamida.^{59,60}

2.8.3 Electroforesis de ADN

La electroforesis es una técnica que se basa en la capacidad de las macromoléculas cargadas para desplazarse en un campo eléctrico a través de un gel u otro tipo de matriz de naturaleza porosa, con una velocidad proporcional a su carga e inversamente proporcional a su tamaño.^{59,61} Los cationes con carga positiva se moverán hacia el electrodo con carga negativa y el anión se moverá hacia el electrodo con carga positiva permitiendo de esta manera la separación de las moléculas a través de un campo eléctrico. Las moléculas de ADN poseen un pH alcalino habitual y una carga negativa uniforme por unidad de masa, lo que hace que su movilidad hacia el ánodo (+) sea determinado por el tamaño de la molécula.^{59,62}

La separación de los fragmentos de ADN se realiza por electroforesis en gel de agarosa (horizontal) o poliacrilamida (vertical), sustancias que permiten manipular el tamaño del poro dependiendo del tamaño de la molécula a separar.⁵⁹

Se aplica una diferencia de potencial eléctrico entre los electrodos de carga opuesta y en una solución iónica para ácidos nucleicos o amortiguador, la migración del ADN es afectada por la composición y la fuerza iónica del amortiguador para electroforesis; en un caso hipotético en que por error se llevase a cabo la electroforesis usando agua en lugar de amortiguador, la conductividad eléctrica disminuiría drásticamente por la falta de iones y en consecuencia, la migración del ADN sería casi nula. Si la concentración de iones fuera excesivamente alta, la conductividad eléctrica sería muy eficiente y se generaría un sobrecalentamiento del amortiguador y calor excesivo podría causar la licuación de la agarosa. Actualmente se dispone de distintos amortiguadores para electroforesis de ADN de doble hebra, los más usados son TAE (Tris, ácido acético y EDTA) y TBE (Tris Borato EDTA); la ventaja de usar TAE es que es menos costoso y a diferencia del TBE permite que las moléculas de ADN migren 10% más rápido.⁶² Una vez finalizada la electroforesis, se pueden observar las moléculas de ADN a través de agentes intercalantes a la doble cadena de ADN como el bromuro de etidio, Sybr green, LC green entre otros.⁶³

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La NH parece ser el resultado de distintas alteraciones en la respuesta inmune, incluyendo la formación de complejos inmunes circulantes y tanto la depuración de estos componentes y la activación de células inflamatorias a través del Fc γ RIIIB tienen gran importancia en distintos mecanismos los cuales pueden ser relacionados con la fagocitosis y la eliminación de los complejos inmunes. En enfermedades autoinmunes como Artritis Reumatoide y Lupus Eritematoso Sistémico, una alteración en la expresión o la presencia de variantes alélicas de los receptores Fc con una funcionalidad alterada contribuyen a la patogénesis de la enfermedad.

Se destaca que el estudio del polimorfismo NA2/NA2 del Fc γ RIIIB en NH no ha sido abordado previamente, por lo que en este proyecto se pretende realizar la determinación del polimorfismo del Fc γ RIIIB (NA2/NA2) usando el método de PCR cualitativo, en personas sanas y pacientes que presenten NH que acuden al INER. La importancia de este estudio radica en que permitirá establecer mecanismos fisiopatogénicos que expliquen el desarrollo de la enfermedad para una efectiva intervención terapéutica con el fin de modular la respuesta inmune.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar si el polimorfismo del FcγRIIIB (NA2/NA2) tiene alguna implicación en la NH.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Extraer ADN de muestras de sangre periférica de pacientes con NH y de donadores sanos.

4.2.2 Identificar el polimorfismo del FcγRIIIB a partir de ADN genómico empleando el método de PCR cualitativo.

4.2.3 Establecer la distribución del polimorfismo NA2/NA2 en pacientes con NH en comparación con donadores sanos.

5. HIPÓTESIS

El polimorfismo NA2/NA2 del receptor FcγRIIIB estará implicado en la NH.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Tipo de estudio: Observacional transversal.

6.2 Población de estudio.

Se estudiaron 30 muestras de pacientes con NH y 30 muestras de donadores sanos que acudieron INER, en la Ciudad de México.

6.3 Criterios de inclusión y exclusión.

6.3.1 Inclusión.

Pacientes con NH que acudieron al INER

Donadores de Banco de Sangre del INER que no presenten la enfermedad.

6.3.2 Exclusión.

Se excluirán pacientes con NH del INER que presenten alguna otra patología como tuberculosis pulmonar, neumonía, fibrosis quística idiopática, etc.

6.4 Variables

Frecuencia, tipos de alelos: NA1/NA2, NA1/NA1, NA2/NA2 y el genotipo homocigoto/heterocigoto para este polimorfismo en cada población de estudio.

6.5 Material y Método

6.5.1 Obtención de material biológico.

Se obtuvieron 5 mL de sangre venosa en tubos Vacutainer con EDTA de pacientes con diagnóstico de NH y de donadores sanos del banco de sangre del INER.

6.5.2 Obtención de ADN genómico.

El ADN genómico fue extraído de sangre total mediante el método de expulsión salina. Se usaron 0.5 mL de sangre total y se adicionó cloruro de sodio (NaCl) 0.9%, posteriormente NaCl 5.0 mM para lisis celular más SDS al 10%; se homogenizó y agregó NaCl saturado, posteriormente se centrifugó a 10° C a 14,000 rpm por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante para realizar la extracción del ADN mediante la mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico 49:1. Se precipitó

con etanol frío al 70%, se centrifugó bajo las condiciones anteriores y se decantó el sobrenadante. Se dejó secar a temperatura ambiente recuperando el ADN en 60 µL de agua DEPC (dietil-pirocarbonato).

6.5.3 Determinación de pureza e integridad de ADN.

Se realizó la determinación de pureza e integridad. Para conocer la pureza se hizo la medición de ADN por espectrofotometría a las longitudes de onda de 260 y 280 nm con el espectrofotómetro (Pharmacia Biotech Gene Quant).

Se visualizó la integridad del ADN por electroforesis horizontal en un gel de agarosa (PROMEGA) al 1.5% en Tris, ácido acético, EDTA (TAE 1X) con un corrimiento de 45 minutos a 95 voltios con Sybr green como cromóforo que se incorpora a la doble cadena de ácido nucleico lo que nos permitió observarlo a través de un transiluminador con luz UV.

6.5.4 Detección del polimorfismo.

Para la detección de los polimorfismos se empleó la técnica de PCR cualitativa usando *GoTaq* DNA polimerasa (PROMEGA) 0.2 µL, dNTP's 10 mM, MgCl 25 mM y amortiguador de reacción (Tris HCl 50 mM, NaCl 50 mM y MgCl 5 mM) y los siguientes oligonucleótidos: primer sentido: 5' CTC AAT GGT ACA GCG TGC TT 3' para el gen NA1 y NA2, *primer* antisentido para el gen NA1: 5' GCC TCA TCT CAA GCC AGG CC 3' y *primer* antisentido para NA2: 5' AAC GAC AGT GGA GAG TAC AGG TG 3'(Invitrogen).

La mezcla de reacción para PCR se colocó en el termociclador Perkin Elmer 480, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95° C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de: desnaturalización a 95° C durante 30 segundos, alineación a 63° C durante 30 segundos y extensión a 72° C durante 1 min. Se trabajó bajo las mismas condiciones para NA1 y NA2.

6.5.5 Gen constitutivo.

Se utilizó gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen constitutivo y se amplificó utilizando los mismos reactivos (Go Taq DNA Polimerasa) y bajo las mismas condiciones. *Primer* 5'-TAG TGA CAT CCA GGA GGT GAT GGT G-3' 3'-ATG GCC CAC ATG GCC T CC GGC AG-5'. Producto de 342 pb (Invitrogen).

6.5.6 Análisis de productos de PCR.

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% con Sybr green visualizados en transiluminador por medio de luz ultravioleta. Se utilizó el marcador de peso para ácidos nucleicos PCR Ranger 100 pb DNA Ladder de NORGEN.

6.6 Diseño estadístico

6.6.1 Análisis estadístico.

Se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg en la población estudiada y para el análisis de la frecuencia alélica se aplicó la prueba χ^2 de acuerdo a Steffensen.⁶⁴

7. RESULTADOS

7.1 Determinación de pureza e integridad de ADN.

Se realizó la determinación espectrofotométrica para todas las muestras, obteniendo las lecturas correspondientes a 260 y 280 nm para calcular la pureza del ADN, la cual fue \geq a 1.8 en todos los casos. Posteriormente se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para las 60 muestras, observando en cada una, ADN integro tanto de pacientes como de personas sanas, tal como se observa en la imagen 7.1.

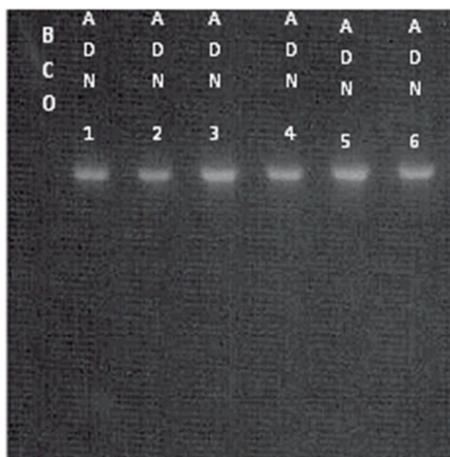


Imagen 7.1 Muestras de ADN genómico tanto de donadores sanos (1 - 3) como de pacientes con NH (4-6). El ADN se observó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5%

7.2 Detección del polimorfismo.

En el cuadro 7.1 y 7.2 se muestran los resultados obtenidos a partir de la técnica de PCR cualitativa para personas sanas y pacientes con NH respectivamente, observando los resultados del gen constitutivo GAPDH y del alelo NA1 y NA2. También se muestra en la última columna el genotipo para cada muestra.

Cuadro 7.1 Resultados de muestras de donadores sanos para el gen constitutivo y para el polimorfismo.

No DE MUESTRA	MUESTRAS	GAPDH	NA1	NA2	GENOTIPO
1	BS42	+	+	+	NA1/NA2
2	BS53	+	+	+	NA1/NA2
3	BS53	+	+	+	NA1/NA2
4	BS56	+	+	+	NA1/NA1
5	BS59	+	+	+	NA1/NA2
6	BS60	+	+	+	NA1/NA2
7	BS61	+	+	+	NA1/NA2
8	BS62	+	+	-	NA1/NA2
9	BS63	+	+	-	NA1/NA1
10	BS64	+	+	+	NA1/NA2
11	BS66	+	+	+	NA1/NA2
12	BS67	+	+	+	NA1/NA2
13	BS68	+	+	+	NA1/NA2
14	BS69	+	+	+	NA1/NA2
15	BS70	+	+	+	NA1/NA2
16	BS71	+	+	-	NA1/NA1
17	BS72	+	+	-	NA1/NA1
18	BS40	+	+	+	NA1/NA2
19	BS76	+	+	+	NA1/NA2
20	BS103	+	+	+	NA1/NA2
21	BS106	+	+	+	NA1/NA2
22	BS107	+	+	+	NA1/NA2
23	BS108	+	+	+	NA1/NA2
24	BS109	+	+	+	NA1/NA1
25	BS01	+	+	+	NA1/NA2
26	BS02	+	+	+	NA1/NA2
27	BS03	+	+	-	NA1/NA2
28	BS04	+	+	-	NA1/NA1
29	BS118	+	-	+	NA2/NA2
30	BS37	+	+	+	NA1/NA2

NA1/NA2 = HETEROCIGOTO

NA1/NA1= HOMOCIGOTO NA1

NA2/NA2= HOMOCIGOTO NA2

Cuadro 7.2 Resultados de muestras de pacientes con NH para el gen constitutivo y para el polimorfismo.

No DE MUESTRA	MUESTRAS	GAPDH	NA1	NA2	GENOTIPO
1	VN04	+	+	-	NA1/NA1
2	VN40	+	+	+	NA1/NA2
3	VN51	+	+	+	NA1/NA2
4	VN52	+	+	+	NA1/NA2
5	VN56	+	-	+	NA2/NA2
6	VN59	+	+	+	NA1/NA2
7	VN60	+	+	+	NA1/NA2
8	VN61	+	+	+	NA1/NA2
9	VN62	+	+	+	NA1/NA2
10	VN63	+	+	+	NA1/NA2
11	VN64	+	+	+	NA1/NA2
12	VN65	+	+	+	NA1/NA2
13	VN66	+	+	+	NA1/NA2
14	VN68	+	+	+	NA1/NA2
15	VN69	+	+	+	NA1/NA2
16	VN70	+	-	+	NA2/NA2
17	VN72	+	+	+	NA1/NA2
18	VN73	+	+	-	NA1/NA1
19	VN74	+	-	+	NA2/NA2
20	VN75	+	+	+	NA1/NA2
21	VN76	+	+	+	NA1/NA2
22	VN78	+	+	+	NA1/NA2
23	VN79	+	+	+	NA1/NA2
24	VN80	+	+	+	NA1/NA2
25	VN81	+	+	+	NA1/NA2
26	VN82	+	+	+	NA1/NA2
27	VN83	+	+	+	NA1/NA2
28	VN84	+	+	+	NA1/NA2
29	VN85	+	+	+	NA1/NA2
30	VN107	+	+	+	NA1/NA2

NA1/NA2 = HETEROCIGOTO

NA1/NA1 = HOMOCIGOTO NA1

NA2/NA2= HOMOCIGOTO NA2

En el cuadro 7.3 se muestra el número de personas sanas y el número de individuos con NH para un total de 30 muestras por cada grupo analizado de acuerdo a los resultados de los cuadros 7.1 y 7.2

Cuadro 7.3 Número total de individuos con NH y sanos para cada genotipo.

GENOTIPO	NUM. DE INDIVIDUOS SANOS	NUM. DE INDIVIDUOS CON NH
NA1/NA1	6	2
NA1/NA2	23	25
NA2/NA2	1	3
TOTAL	30	30

7.3 Análisis de productos de PCR.

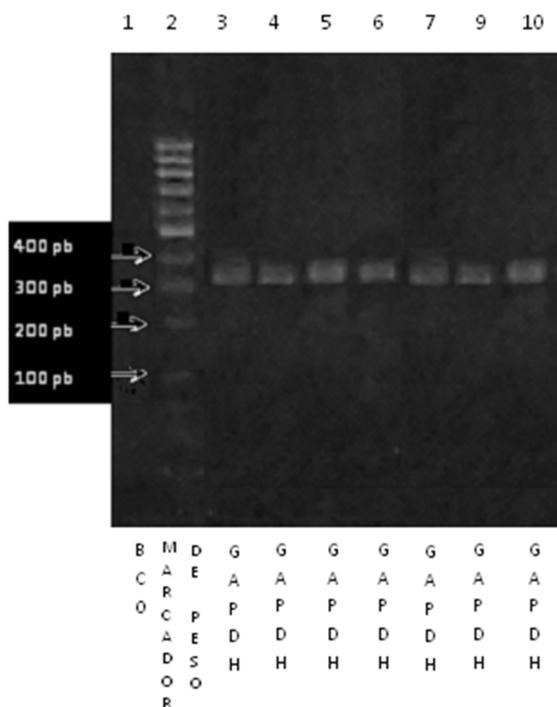


Imagen 7.2 Productos de PCR para el gen constitutivo GAPDH. Las muestras se separaron en gel de agarosa al 2% usando marcador de peso de 100 pb de NORGEN. Se observa el producto de 342 pb tanto de pacientes con NH (3- 6) como de donadores sanos (7- 10).

En la imagen 7.3 se observa la amplificación del fragmento correspondiente del gen *FcγRIIB* mostrando los siguientes productos: 119 pb para NA1 y 172 pb para NA2 en gel de agarosa al 2%.

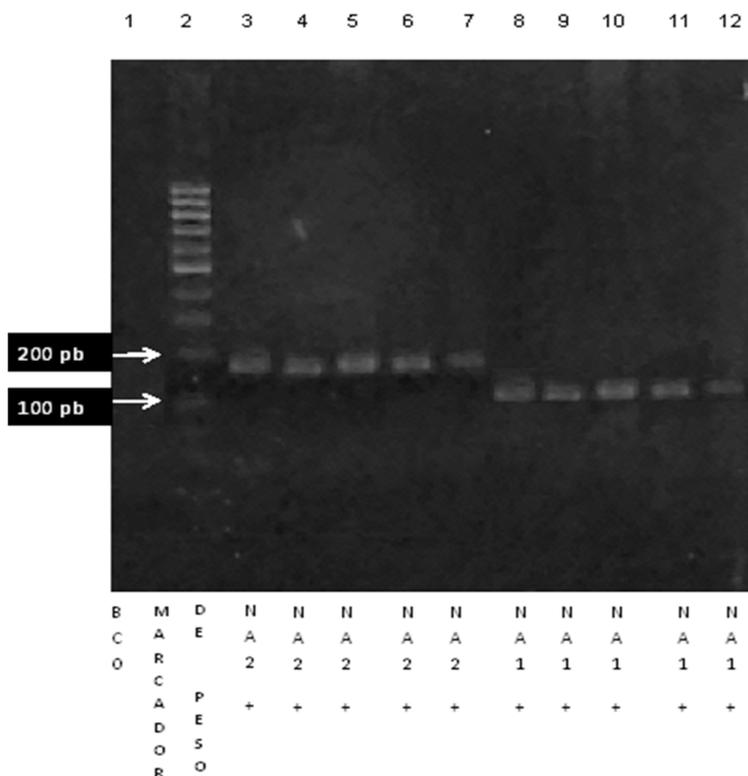


Imagen 7.3 Productos de PCR para NA1 y NA2. Las muestras se separaron en gel de agarosa al 2% usando marcador de peso de 100 pb de NORGEN. Se observan los productos de 172 pb para NA2 y 119 pb para NA1 tanto de pacientes con NH (3-5, 8-10) como de donadores sanos (6, 7, 11 y 12).

La amplificación del gen constitutivo y de los alelos NA1 y NA2 se realizó para 60 muestras, utilizando en todos los casos, el mismo marcador de peso de 100 pb de NORGEN.

7.4 Análisis estadístico

En el cuadro 7.4 se observa la frecuencia alélica y genotípica, calculada para ambas poblaciones de estudio. Los resultados obtenidos están en equilibrio Hardy-Weinberg.

Cuadro 7.4 Frecuencia alélica y genotípica para individuos con NH y sanos.

Población estudiada	n	FRECUENCIA ALÉLICA		FRECUENCIA GENOTÍPICA			EQUILIBRIO DE H- W
		Alelo NA1	Alelo NA2	NA1/NA1	NA1/NA2	NA2/NA2	
SANOS	30	0.58	0.42	0.20	0.767	0.033	Si
NH	30	0.48	0.52	0.067	0.833	0.10	Si

Abreviaciones: n: número total; H-W: Hardy-Weinberg.

X^2 , p= 0.360

El análisis estadístico permitió comparar los resultados de los genotipos de las dos poblaciones estudiadas, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ellos (X^2 , $p>0.05$).

8. DISCUSIÓN

Se sabe que la información contenida en el ADN es convertida a información contenida en una secuencia de aminoácidos presente en las proteínas y esas proteínas son los componentes de células, así como también son encargadas de todas las reacciones metabólicas.⁶⁵ El gen que codifica una proteína presenta formas diferentes en cada individuo, a los múltiples genes del mismo *locus* génico que codifican la misma proteína se les denomina alelos, si los alelos son iguales el individuo se denomina homocigoto y si son diferentes se denomina heterocigoto. Las proteínas sintetizadas pueden presentar alteraciones las cuales se deben a variaciones en la secuencia del ADN (polimorfismos) variación de un solo par de bases “SNP” (single nucleotide polymorphism).⁶⁶ Con estos antecedentes se ha estudiado la presencia del polimorfismo del FcγRIIB como una posible implicación en diversas enfermedades incluyendo artritis reumatoide y lupus eritematoso.^{42,67,68}

En este trabajo estudiamos la posible asociación de éste polimorfismo con la NH debido a que aún no se había estudiado en población alguna con esta enfermedad, sólo en otras enfermedades que siguen el mismo mecanismo inmunológico de daño al formarse complejos inmunes. Como se observa en el cuadro 7.4, los resultados obtenidos con las muestras de ambas poblaciones, están en equilibrio Hardy-Weinberg (χ^2 , $p > 0.05$). Los resultados de los genotipos del polimorfismo de los pacientes comparados con los donadores sanos se encuentran distribuidos de manera muy similar (0.58 para sanos y 0.48 de frecuencia alélica de NA1 para pacientes con NH y 0.42 para sanos y 0.52 de frecuencia alélica de NA2 para pacientes con NH), indicando su baja frecuencia en los pacientes. El análisis estadístico nos arroja una $p=0.360$ lo que indica que no es estadísticamente significativa y por lo tanto no está asociado el polimorfismo con esta enfermedad en particular, aunque si se ha visto relacionado en otras enfermedades mencionadas anteriormente. Este gen presenta otras cuatro

alteraciones genéticas que se pretenden estudiar en un futuro porque pudieran estar involucradas en esta patología.

Con respecto a la extracción del ADN, se observó una integridad adecuada y una pureza mayor o igual a 1.8 por lo que fueron óptimos para el estudio. Los productos amplificados se observaron como una sola banda del peso esperado: 119 pb para NA1 y 172 pb para NA2, así como 342 pb para el gen constitutivo y sin amplificación para el blanco de reacción en todos los casos. Cabe mencionar que la recolección de muestras de pacientes que presentaron la enfermedad fue difícil debido a lo complejo que resulta el diagnóstico por su semejanza con el cuadro clínico con otras patologías pulmonares. Para confirmar la presencia de la enfermedad se requirió de más tiempo para contar con pruebas de laboratorio, pruebas de función pulmonar, imagenología y lavado broncoalveolar, para poder incluirlos en este estudio. Cabe mencionar que se requiere analizar una población mayor en estudios posteriores.

9. CONCLUSIONES.

1. Con la metodología aplicada se logró obtener ADN genómico de buena calidad, integridad y pureza, el cual fue empleado para la identificación del gen polimórfico *FcγRIIIB* NA2/NA2 en muestras de sangre periférica de pacientes con NH y personas sanas, aplicando la técnica de PCR convencional.
2. Se estableció la distribución del polimorfismo NA2/NA2 en pacientes con NH en comparación con donadores sanos.
3. **Los resultados no mostraron una relación significativa del polimorfismo NA2/NA2 del receptor *FcγRIIIB* con la NH por lo que se concluye que no esta asociado a tal enfermedad.**

10. ANEXOS.

10.1 Reactivos

10.1.1 Cloruro de sodio (NaCl) 5 mM

Cloruro de sodio.....0.29 g

Aforar a 100 mL con agua bidestilada

10.1.2 Lauril sulfato de sodio al 10% (SDS 10%)

Lauril sulfato de sodio.....10 g

Agua destilada cbp.....100 mL

10.1.3 Tris-acetato de sodio-EDTA 10X (TAE 10X)

Tris base.....48.4 g

Ácido acético glacial.....114.2 mL

EDTA 0.5 M pH 8.0.....20 mL

Aforar a 1 Litro de agua destilada

10.1.4 TAE 1X

TAE 10X.....100 mL

Agua destilada cbp.....1000 mL

10.1.5 Amortiguador de carga para muestra de ADN

Azul de bromofenol.....25 mg

Xilenecianol.....25 mg

Glicerol.....5 mL

Aforar a 10 mL con TAE 1X

10.1.6 Cromóforo

SYBR® Green.....1 μ L

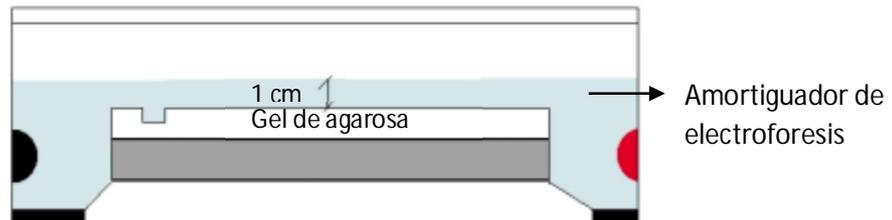
Agua destilada..... 5 μ L

10.2 Electroforesis de moléculas de ADN mayores de 100 pb

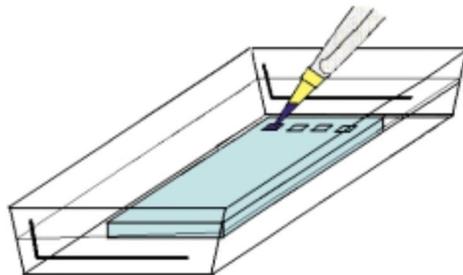
1. Pesar 2.0 g de agarosa y disolverlos en 100 mL de agua destilada.
2. Disolver por calentamiento hasta observar una solución totalmente transparente aproximadamente 60° C.
3. Esperar a que tenga una temperatura aproximadamente de 37° C y vaciar el contenido en el porta gel de la cámara de electroforesis.



4. Esperar a que polimerice y colocar en la cámara con la solución amortiguadora de corrida. Llenar el tanque de la cámara por encima de un cm de gel.



5. Cargar las muestras mezcladas con amortiguador de carga y el agente intercalante.



6. Correr a 95 V por 1h.

7. Visualizar en transiluminador de luz UV.

11. REFERENCIAS

1. Cotran R, Kumar V, Collins T. Patología estructural y funcional. 6ª ed. México: McGraw-Hill, 2000: 1475.
2. McGowan P, Jefferies A, Turley A. Respiratory System. 2ª ed. España: Elsevier, 2003: 267.
3. Cano VF, Ibarra CP, Morales GJ. Enfermedades respiratorias. Temas selectos. Madrid: Elsevier, 2006: 416.
4. Pocock G, Richards C. Fisiología humana. La base de la medicina. 2ª ed. Barcelona: Masson, 2005: 712.
5. Tortora G, Derrickson B. Introducción al cuerpo humano. Fundamentos de anatomía y fisiología. México: Panamericana, 2008: 609.
6. Travis WD, King TE, Bateman E, Lynch D, Capron F, Center D, et al. American Thoracic Society / European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. Am J Respir Crit Care Med 2002; 165:277.
7. Sobradillo PV. Enfermedad pulmonar intersticial. Neumonitis por hipersensibilidad. Medicine 2010; 10 (65): 4449-4455.
8. Hinojosa MM. Problemas diagnósticos en la neumonitis por hipersensibilidad. Alergol Inmunol Clin 2000; 15 (2): 1-15
9. Cebollero P, Echechipía S, Echevoyen A, Lorente MP, Fanlo P. Neumonitis por hipersensibilidad (alveolitis alérgica extrínseca) An Sist Sanit Navar 2005; 28 (1): 91-99.
10. Mejía M, Suárez T, Arreola A, Estrada A, Zamora A, Juárez F, et al. Neumonitis por hipersensibilidad. Neumología y Cirugía de Tórax 2007; 66(3):115-123.

-
11. Selman M, Lacasse Y, Pardo A, Cormier Y. Hypersensitivity pneumonitis caused by fungi. *Proc Am Thorac Soc* 2010; 7(3):229-236.
 12. Selman M, Lacasse Y, Pardo A, Cormier Y. Hypersensitivity pneumonitis caused by fungi. *Proc Am Thorac Soc* 2010; 7(3):229-236.
 13. Woda BA. Hypersensitivity pneumonitis: An Immunopathology Review. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132(2): 204–205.
 14. Camarena A, Juárez A, Mejía M, Estrada A, Carrillo G, Zuñiga J. Major histocompatibility complex and tumor necrosis factor- α polymorphisms in pigeon breeder's disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(7):1528–1533.
 15. Hill MR, Briggs L, Montañó M, Estrada A, Laurent G, Selman M. Promoter variants in tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) protect against susceptibility in pigeon's breeders' disease. *Thorax* 2004; 59(7): 586–590.
 16. King TE Jr, Costabel U, Lynch D, Myers JL, Panos RJ, Raghu G, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:646–664
 17. Selman M. Hypersensitivity pneumonitis, en: interstitial lung disease. 4^a ed King TE, Schwarz MI (eds), 2003: 452.
 18. Carrillo RJ, Sansores R, Castrejón A, Pérez PR, Ramírez VA, Selman M. Hypersensitivity pneumonitis in Mexico City. *Salud pública Méx* 2000; 42(3): 201-207.
 19. Bourke SJ, Dalphin JC, Boyd G, Mc Sharry C, Baldwin CI, Calvert JE. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts. *Eur Respir J* 2001; 18 (32):81-92.
 20. Martínez GC, Rego FG. Enfermedades respiratorias de origen ocupacional. *Arch Bronconeumol* 2000; 36: 631-644.

-
21. Terho EO, Lindström P, Mäntyjärvi R, Tukiainen H, Wager O. Circulating immune complexes and rheumatoid factors in patients with farmer's lung. *Allergy* 1983; 38 (5):347-352.
 22. Patel AM, Ryu JH, Reed CE. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts and future questions. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108(5): 661-670.
 23. Braun SR, Flaherty DK, Burrell R, Rankin J. Importance of anti-lung antibody in farmer's lung disease. *Am J Med* 1983; 74(4):535-539.
 24. Aguilar LD, Novelo RV, Martínez CE. Antiavian antibodies and rheumatoid factor in pigeon breeder's disease. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 226-232.
 25. Téllez AM, Aguilar LD, Retana VN, Martínez CE. IgM, IgG, and IgA rheumatoid factors in pigeon hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Lab Anal* 2007; 21(5):315-321.
 26. Aguilar LD, Téllez AM, Arellano GJ, Martínez CE. Interference effect by rheumatoid factor in the detection of antiavian antibodies in pigeon breeder's disease. *Clin Exp Med* 2002; 2(2):59-67.
 27. Maini RN, Zyberk CP. The significance of CD5+ B cells in rheumatic diseases. *Scand J Rheumatol* 1988; 76 (1):237-242.
 28. Floyd M, Tesar JT. The role of IgM rheumatoid factor in experimental immune vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1979; 36:165-174.
 29. De Horatius RJ. 1972. Immunofluorescence and immunological studies of rheumatoid lung *Arch. Intern Med* 1972; 129:441.
 30. Calvert JE. Pigeon fancier's lung a complex disease? *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 166-175.

-
31. Xu G, He Q, Shou Z, Wang H, Zhang X, Wang Y, Chen Y, Chen J. NA1/NA2 heterozygote of Fcgr3b is a risk factor for progression of IgA nephropathy in chinese. *J Clin Lab Anal* 2007; 21(5):298-302.
 32. Daêron M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 203-234.
 33. Salmon JE, Pricop L. Human receptors for immunoglobulin G: key elements in the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 739–750.
 34. Abbas AK, Lichtman AH. *Inmunología celular y molecular*. 5ª ed. Madrid: Elsevier, 2004:321-323.
 35. Patiño G, Hiromi L. Receptores Fc de la inmunoglobulina y: aspectos básicos e implicaciones clínicas. *Rev Asoc Colomb Alerg Inmunol* 2003; 12(1): 5-18.
 36. Parham P. *Inmunología*. 2ª ed. Buenos Aires: Panamericana, 2005: 470.
 37. Parslow G, Suites P, Terr I, Imbaden B. *Inmunología Básica y Clínica*. 10ª ed. México: Manual Moderno, 2002:124-125.
 38. Gómez LM, Cañas C, Anaya JM. Receptores Fc γ y Autoinmunidad *Acta Médica Colombiana* 2005; 30 :27-35
 39. Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I. *Inmunología*. 7ª ed. Madrid: Elsevier, 2007:76-77.
 40. Ravetch JV. Immune inhibitory receptors. *Science* 2000; 290, 84-89.
 41. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 275-290.
 42. Delves J, Martin J, Burton R, Roit M. *Inmunología fundamentos*. 11ª ed. Buenos Aires: Panamericana, 2008:119.

-
43. Ory PA, Goldstein IM, Kwoh EE, Clarkson SB: Characterization of polymorphic forms of Fc receptor III on human neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 83:1676.
 44. Huizinga TW, van der Schoot CE, Jost C, Klaassen R, Kleijer M, von dem Borne AE, et al. PI-linked FcRIII is released on stimulation of neutrophils. *Nature* 1988; 333:667.
 45. Qiu WQ, de Bruin D, Brownstein BH, Pearse R, Ravetch JV: Organization of the human and mouse low-affinity FcγR genes: Duplication and recombination. *Science* 1990; 248: 732.
 46. Nimmerjahn F, Ravetch J. Divergent immunoglobulin-G subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 2005; 310: 1510-1512.
 47. Salmon JE, Millard SS, Brogle NL, Kimberly RP. Fc gamma receptor IIIb enhances Fc gamma receptor IIa function in an oxidant dependent and allele sensitive manner. *J Clin Invest* 1995; 95: 2877-2885.
 48. Radaev S, Motyka S, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Sun PD The structure of a human type III Fcγ receptor in complex with Fc. *J Biol Chem* 2001; 276(19):16469-77.
 49. Huizinga TW, Kleijer M, Tetteroo PAT, Roos D, von dem Borne AEGKr: Biallelic neutrophil NA antigen system is associated with a polymorphism on the phosphoinositol-linked Fcγ receptor III (CD16). *Blood* 1990; 75: 213.
 50. Ory PA, Clark MR, Kwoh EE, Clarkson SB, Goldstein IM: Sequences of complementary DNAs that encode the NA1 and NA2 alloantiforms of Fc receptor III on human neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84: 1688.
 51. Ravetch JV, Perussia B. Alternative membrane forms of FcγRIII (CD16) on human natural killer cells and neutrophils. *J Exp Med* 1989; 170: 481.
 52. Fromont P, Bettaieb A, Skouri H, Floch C, Poulet E, Duedari N, Bierling P: Frequency of the polymorphonuclear Fcγ receptor III deficiency in the

-
- French population and its involvement in the Quantita development of neonatal alloimmune neutropenia. *Blood* 1992; 79: 2131.
53. Haas de M, Kleijer M, van Zwieten R, Roos D, von dem Borne AE. Neutrophil FcγRIIIb deficiency, nature and clinical consequences: A study of 21 individuals from 14 families. *Blood* 1995; 86: 2403.
54. Bux J, Stein EL, Bierling P, Fromont P, Clay M, Stroncek D, et al. Characterization of a new alloantigen (SH) on the human neutrophil Fcγ receptor IIIb. *Blood* 1997; 89 (3):1027-1034.
55. Takai T. Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity. *Journal of Clinical Immunology* 2005; 25: 1-18.
56. Koene HR, Kleijer M. Fc gamma receptor IIIb gene duplication: evidence for presence and expresion of three distict Fc gamma receptor IIIB genes in individuals. *Blood* 1998; 91: 673-679.
57. Zavala CE. Manual de técnicas básicas de biología molecular. Mérida: Universidad Autónoma de Yucatán, 2005: 194.
58. Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ. Genética médica. 4ª ed. Barcelona: Elsevier Mosby-Hill, 2011: 368.
59. Anaya JM, Shoenfeld Y, Correa P, García CM, Cervera R. Autoinmunidad y enfermedad autoinmune. 1ª ed. Colombia: Elsevier, 2005: 516,517.
60. Rodríguez SI, Barrera SH. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL* 2004; 7(3):229-236.
61. Berk A, Lodish H. Biología celular y molecular. 5ª ed. Buenos Aires: Panamericana, 2005: 973.
62. Yábar VC. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Lima: Instituto Nacional de Salud, 2003: 59.

-
63. Legorreta HM, Soto CI, Tusié LT, Moreno FL, Hernández CF, Machuca RC, et al. Manual de prácticas para el laboratorio de genética clínica parte II. México D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, 2009: 157.
64. Steffensen R. Gülen T, Varming K. Jersild C. FcgRIIIb polymorphism: evidence that NA1/NA2 and SH are located in two closely linked loci and that the SH allele is linked to the NA1 allele in the Danish population. *Transfusion* 1999; 39: 593-598.
65. Alcamo E. DNA Technology. The Awesome Skill. 2^a ed. Farmingdale: Academic Press, 2001: 348.
66. Luque CJ, Herráez SA. Biología molecular e ingeniería genética. Universidad de Alcalá. Madrid: Harcourt, 2001: 469.
67. Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, et al. Fcγ receptor Gene Polymorphism in Japanese patients with Systemic Lupus erythematosus: contribution of FCGR2B to genetic susceptibility. *Arthritis and Rheumatism* 2002; 46 (5): 1242-54.
68. Nieto A, Cáliz R, Pascual M, Matarán L, García S, Martín J. Involvement of Fc gamma receptor IIIA genotypes in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(4): 735-739.