



**Universidad Nacional Autónoma
de México
Facultad de estudios superiores
“Zaragoza”**



**Polimorfismos de un solo nucleótidos de la familia
de receptores NKG2 en asma Presentes en la
superficie de las células NK como un factor de
riesgo para el desarrollo de asma**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Químico Farmacéutico biólogo

PRESENTA

DANIEL MONTES HUERTA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ

ASESOR

MARÍA LOURDES VEGA NAVARRETE

CIUDAD DE MÉXICO

2018



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.



El proyecto se desarrolló en el laboratorio de HLA en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, CMN-SXXI, IMSS.

Proyecto autorizado por la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS con número de registro R-2014-785-086.

Apoyo financiero por CONACYT, Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social con clave 233422.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de estudiar una carrera universitaria, y no sólo de los beneficios de estudiar una carrera sino por formarme como persona para servir a mi sociedad que en los últimos años necesita más de nosotros.

Agradezco también a mi facultad por brindarme un lugar entre sus pupitres para estudiar "Química" que me apasiona tanto, además de todos los profesores de los cuales aprendí de sus conocimientos y experiencias de la vida diaria y por la cual nos abren los ojos para no caer en la negatividad y pesimismo con el fin de crecer como personas.

Así mismo quiero agradecer también a la unidad de investigación médica e inmunología, Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, por haberme permitido realizar mi proyecto de tesis en sus instalaciones.

A la Dra. Martha Estela Pérez Rodríguez primeramente haberme permitido realizar mi trabajo de tesis en su laboratorio y segundo por haberme tenido la paciencia en todo el tiempo que estuve realizando la tesis y por corregirme en cada tropiezo que tenía, en verdad se lo agradeceré toda la vida.

A la Dra. María Lourdes Vega Navarrete por haber aceptado ser mi asesora y por el apoyo que me dio, además de las pequeñas clases de genética que me dio para entender lo que tenía que corregir.

A mis amigos, sobre todo Esteffy, Wendy, Julian, Scarlet, Marco, Karen, Aarón, Ruy, Luz Mary y muchos más que me han apoyado en muchas ocasiones y me han sacado de apuros, a Esteffy por esas clases de todo tipo desde inglés hasta hacer bolitas y palitos y por compartir gustos culinarios, a Scarlet por ser una amiga incondicional y apoyarme muchas veces cuando lo necesite, sobre todo cuando mis bolsillos estaban vacíos, a Marco por ser un gran amigo y colega, sin tu ayuda a veces hubiera tirado la toalla, a ti Karen gracia por tener gustos "parecidos" a los míos y poder platicar de ello conmigo sin ti no aguantaría las pláticas de Scarlet y Aarón, Wendy gracias por dejarte masajearme en verdad disfrute hacerlo, Ruy aunque no te veo seguido me gusta platicar contigo tanto de tus gustos como de tus opiniones acerca de la humanidad y cosas así.

DEDICATORIA

A mis padres que tanto se han esforzado por darme una educación y que a pesar de haber tenido y tener obstáculos nunca se han rendido y siguen trabajando duro para poder verme terminar mi carrera, en verdad los quiero y sin ustedes no podría haber hecho nada.

A mis abuelos les debo mucho y son una parte importante en mi vida por eso quiero dedicarles a cada uno una pequeña dedicatoria

Abuelo Felipe: aunque no tuve la dicha de convivir contigo muchos años ya que te fuiste de mi vida cuando era un niño, sé que estarías orgulloso de mí y quiero decirte que me hubiera gustado platicar contigo en este momento acerca de todo lo que he vivido, y muchas gracias por aquellas morrallas.

Abuelo Eleazar: tú fuiste mi maestro de vida y por eso quiero decirte gracias! Sin tus regaños y tu forma de ser tan recta no hubiera sido lo que soy ahora por eso y mucho más y sé que estarías orgulloso de mí. "Comprare ese pescado tan grande que te prometí".

Abuela Emelia: tú fuiste como mi segunda madre por eso te estoy tan agradecido de haberte tenido, pero nunca imagine que te irías de mí, así que lo único que puedo hacer para honrar tu memoria es triunfar en esta vida y ser una persona de bien GRACIAS POR TODO!

Abuela Concepción: gracias a dios tú aun estás conmigo y quiero decirte muchas gracias por todo lo que me has enseñado y dado sobre todo tus consejos en verdad muchas gracias abuelita "CONCHIS"

A mis tíos, a cada uno de mis tíos le doy gracias a Dios por haberlos conocido y aunque a algunos no los veo seguido, pero son igual de importantes para mí y quiero decirles que gracias a todos por sus buenas platicas y consejos.

A mi hermano que gracias a el quien fue un gran apoyo cuando más lo necesité desde que tengo memoria, gracias por compartir buenos momentos conmigo.

A mis sobrinitas Romily y Vanessa que son mi motivación de seguir adelante y gracias por ser tan traviesas y ocurrentes.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	3
2.1 Asma.....	3
2.2 Fisiopatología.....	4
2.3 Partículas en el aire.....	6
2.4 Género.....	9
2.5 Cambios morfológicos o funcionales en las vías respiratorias...11	
2.6 Microorganismos.....	12
2.7 Genéticos.....	13
2.8 Fármacos.....	15
2.9 Células NK y Receptores NKG2.....	16
3. Planteamiento del problema.....	20
4. Hipótesis.....	21
5. Objetivos.....	22
5.1 General.....	22
5.2 Particulares.....	22
6. Material y métodos.....	23
7. Resultados	29
8. Discusión.....	36
9. Conclusiones.....	40
10. Perspectivas.....	40
11. Referencias.....	41

1. Introducción

El asma es una enfermedad crónica que afecta aproximadamente a 300 millones de personas en el mundo, la cual se caracteriza por ataques periódicos de sibilancias, dificultad para respirar, tos y opresión en el pecho, especialmente por la noche o en la madrugada. En México, en el boletín de epidemiología que publica la Secretaría de Salud, se estimó alrededor de 250,000 casos nuevos de asma en el año 2016, número de incidencia elevado que tiene un valor trascendental para la salud de la población adulta e infantil en nuestro país, al igual que a nivel mundial especialmente en países de primer mundo. Estos datos son inquietantes por lo que en la actualidad se han realizado investigaciones en busca de factores de riesgo como partículas en el aire y fármacos que se encuentren asociados al asma con la finalidad de prevenir la misma. Por otra parte, también se han realizado estudios que involucran la genética de los pacientes, por ejemplo, se ha documentado que ciertas variantes genéticas presentes en genes de citocinas y receptores celulares tienen relación con la enfermedad; al respecto, se ha observado que ciertos genotipos podrían encontrarse con mayor frecuencia en pacientes con asma, lo cual representaría un factor de riesgo. Parte de la patogénesis del asma comprende la participación de células NK, por lo que resulta importante analizar los receptores que dan lugar a su activación desde el enfoque genético, es por ello que en esta investigación se pretende estudiar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, *single nucleotide polymorphism*) presentes en genes de la familia de receptores NKG2, mediante el uso de la técnica de PCR en tiempo real.

En México este tipo de investigaciones no han sido publicadas, sin embargo existen algunas publicaciones de universidades de diferentes países como EUA, Alemania, Croacia, Reino Unido, entre otras. De tal manera que realizar este trabajo en población mexicana aportaría un posible factor de riesgo y por lo tanto una posible herramienta para diagnóstico, pronóstico o tratamiento temprano de esta enfermedad.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Asma.

El asma es una enfermedad crónica que afecta a más de 300 millones de personas en el mundo, con unas 250 000 muertes anuales atribuidas por esta enfermedad^{1,2,3,4}. En México la dirección general de epidemiología de la Secretaría de Salud reportó una incidencia de aproximadamente 200 000 casos nuevos de asma en el año 2015, con una prevalencia en niños del 2% al 10%^{5,6}.

El asma se define como una enfermedad crónica de las vías respiratorias inferiores en donde participan diferentes tipos de células, mediadores químicos y citocinas, la cual se caracteriza por la inflamación de las vías respiratorias provocando síntomas como sibilancias, disnea, opresión en el pecho y tos, que provocan una disminución del flujo de aire total o parcialmente reversible y que normalmente se presentan en la noche o en la madrugada^{5,6,7}.

El asma puede ser clasificada de acuerdo a su etiología en:

Asma alérgica

Este tipo de asma se desarrolla en edades tempranas de la vida, siendo , y los principales factores ácaros, cucarachas, polvo casero, pelo o plumas de animales, pólenes, hongos y alimentos, la cual es caracterizada por un elevado nivel de IgE sérica, historia de atopia familiar y las pruebas de sensibilización a alérgenos son positivas^{8,5,9}.

Asma no alérgica

Este tipo de asma se presenta en edades después de los 35 años, siendo los factores desencadenantes infecciones virales en edades tempranas, cambios climatológicos, ejercicio, irritantes químicos y antiinflamatorios no esteroideos, que está caracterizada por que no existe una historia atópica familiar, el nivel de IgE es normal y las pruebas de sensibilización a alérgenos son negativas^{8,5,9}.

2.2. Fisiopatología

El asma se presenta a partir de una respuesta inflamatoria en las vías aéreas, en el caso del asma alérgica se origina una reacción de hipersensibilidad tipo 1 provocada por la re-exposición a un tipo de antígeno llamado alérgeno, en el cual se caracteriza por la presencia de mastocitos degranulados, eosinófilos y subpoblaciones de linfocitos T y B, los cuales son los responsables de los síntomas de la enfermedad, además de la inflamación se han observado otros efectos como la hiperplasia epitelial de las células caliciformes, depósito de colágeno subepitelial e hipertrofia del musculo liso, que conjuntamente se llama remodelación de la vía respiratoria fig 1^{10, 11}.

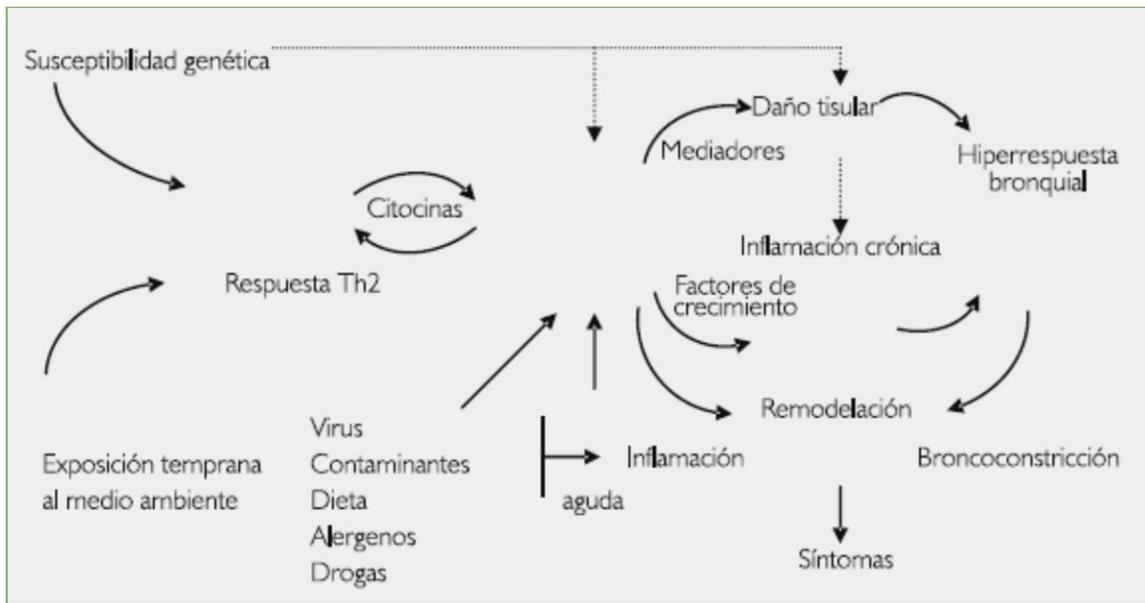


Figura 1 interacción entre factores ambientales y genéticos en la patogénesis del asma, imagen tomada de Blanca Estela del Río Navarro. Artículo de revisión asma 2009.⁸

En el asma se liberan hasta 100 mediadores inflamatorios dentro de los que se encuentran mediadores lipídicos, péptidos inflamatorios, citocinas, quimiocinas, enzimas inflamatorias y factores de crecimiento, en donde las células estructurales de las vías aéreas son las que sintetizan en mayor medida estos mediadores.¹² En las vías respiratorias las células que están mayoritariamente implicadas son los linfocitos T cooperadores (LThCD4+), sus productos de secreción tienen la función central de organizar la respuesta inflamatoria de las vías respiratorias de asmáticos, en las Th2 antígeno específicas contribuyen con la síntesis de IL-4, IL-13, IL-5 e IL-9.¹³ las células NK, mastocitos activados y aumento de eosinófilos activados también provocan la liberación de mediadores inflamatorios y aunado a las TH2 son un patrón característico del asma¹³.

La expresión de los mediadores inflamatorios está regulada por transcripción genética, y a la vez, es controlada por factores de transcripción proinflamatorios,

como el factor nuclear kappa-beta (NF- κ β), la proteína activadora-1 (AP-1), factor nuclear de células T activadas (NF-AT) y transductores de señales y activadores de transcripción (STAT), los cuales se unen a secuencias en el DNA, y en la cual intervienen coactivadores como p300/CREB, proteína de unión a CREB (CBP), factor activador de p300/CBP (pCAF) y swl/snf (Switch/Sucrosa no fermentable) que conllevan a la expresión de genes proinflamatorios¹⁰.

2.3 Partículas en el aire

Los contaminantes en el aire son un factor importante para el desarrollo de asma, tanto por el ambiente en el que vivimos, como por el tiempo de exposición. El aire tiene una composición química principalmente de nitrógeno y oxígeno, además existen otros componentes como el dióxido de carbono, Argón, Helio, Neón, entre otros que se encuentran en menor proporción y que no han sido reportados como nocivos en bajo porcentaje; por otra parte, la contaminación del aire ha cambiado su composición, esto lleva a un efecto de alta exposición a partículas para las personas, que a largo plazo existe el riesgo de desarrollar enfermedades pulmonares y cardiacas¹⁴. En la Ciudad de México, existen centros de monitoreo para determinar las características del aire en donde clasifican por zonas su calidad y se dan recomendaciones a la población de las actividades que se pueden realizar y cuáles no, además se tiene conocimiento de que las partículas en el aire están relacionadas con el asma alérgica¹⁵.

En una investigación en nuestro país, que tenía como objetivo evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad de la fracción orgánica soluble que contienen los

hidrocarburos aromáticos policíclicos, y en la cual incluyo diferentes áreas de la ciudad de México, concluyó que la zona centro es la más propensa a daño citotóxico en células pulmonares, esto debido a que en esa zona se encuentra una mayor concentración de automóviles que son la principal fuente de hidrocarburos aromáticos policíclicos¹⁵.

Otras investigaciones dedicadas al estudio de los contaminantes en el aire en busca de alguno en particular que sea un factor de riesgo para el asma y los mecanismos por los que pueden alterar el sistema inmune han aportado que, los contaminantes del aire como el ozono (O₃), dióxido de nitrógeno (NO₂) y partículas de polvo con un tamaño menor de 10 µm (PM del inglés *particulate matter*) pueden por si solas desencadenar una respuesta inflamatoria en la zona pulmonar y exacerbar las crisis respiratorias de sujetos asmáticos¹⁶. el efecto de los contaminantes en el aire no se limita a una respuesta inflamatoria, en la que se sintetizan IL-1, TNF-α, GM-CSF e IL-8 y se observa un aumento en la actividad quimiotáctica de los eosinófilos y neutrófilos, sino que al entrar las PM en las células alveolares se generan radicales libres, aunque los radicales libres son neutralizadas por enzimas como la catalasa, existen ocasiones donde las enzimas no son suficientes lo que provoca que los radicales libres generen un daño tisular a nivel de pulmón, bronquios, bronquiolos, que puede generar o amplificar la respuesta inflamatoria dependiendo de la concentración y la dosis^{16,17}. En consecuencia los radicales libres (O₃) dañan las membranas celulares directamente y estas a su vez pueden activar vías de transcripción mediadas por NF-κβ y AP-1 aumentando la expresión de genes de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, con el posterior aumento del infiltrado celular, la producción de moco y la broncoconstricción^{16,18}.

Por otra parte, los alérgenos son partículas que pueden inducir una respuesta de hipersensibilidad, se conocen algunos que son provenientes de ácaros (*Dermatophagoides*), pólenes, cucarachas, componentes bacterianos como el lipopolisacárido, los cuales pueden estar presentes en el aire tanto del interior como del exterior de los hogares y pueden sensibilizar a la población dando como resultado la aparición de alergias^{16,19}. La alergia respiratoria química, al igual que otros tipos de alergia se desarrolla en dos etapas, la primera o etapa de inducción, en el caso del asma la sensibilización del tracto respiratorio, es caracterizada por una respuesta inmunológica contra el alérgeno, y la segunda o etapa de obtención en la que un sujeto sensibilizado es expuesto al mismo alérgeno por una segunda o más ocasiones, lo que provoca que la respuesta inmune sea más agresiva con un tiempo de respuesta menor, provocando inflamación en las vías respiratorias como se observa en la rinitis alérgica y el asma²⁰.

Tras la sensibilización contra un alérgeno el sujeto tiende a producir IgE e IgG específicas contra el alérgeno previamente expuesto; por otra parte la proliferación de células proinflamatorias se ve aumentada cuando el alérgeno está en presencia de gases y partículas, como se observó en una investigación en la cual mencionan que si un alérgeno que normalmente no es alergénico penetra al sujeto en presencia de gases o PM, el sujeto producirá IgE específicas en contra de dicho alérgeno, con la aparición de síntomas clínicos ante una posterior exposición al mismo alérgeno¹⁶.

2.4 Género

Las diferencias de género como factor de riesgo para el desarrollo de asma están bien descritos, como se ha reportado en enfermedades cardiovasculares y autoinmunes, metabolismo y cognición, ya que se considera que las mujeres poseen fenotipos más susceptibles^{21,22,23}. El asma se ha observado que la mayor incidencia en la niñez es por parte de los varones que de las mujeres para desarrollar la enfermedad, sin embargo la incidencia se iguala en la pubertad, una vez en la vida adulta la incidencia se invierte y las mujeres muestran la mayor prevalencia y riesgo de desarrollar la enfermedad en esta edad^{22,24,25}.

La explicación del por qué los valores de incidencia de asma en mujeres son mayores en la vida adulta en comparación los hombres se han discutido en diferentes estudios y varían por diferentes factores como cambios hormonales y el tamaño de las vías respiratorias además, se ha observado que en la adolescencia aumenta el riesgo para el desarrollo de la enfermedad²⁶. De acuerdo a un estudio en edades desde los 11 años en adelante en las mujeres es cuando la incidencia va en aumento hasta llegar a un valor similar al de los hombres, se utilizaron encuestas donde incluyeron adolescentes, los cuales fueron clasificados en diferentes rangos de edad de la pubertad, los resultados mostraron que la prevalencia del asma en mujeres (7.4%) fue similar que en los hombres (7.7%) en el grupo de edad de 11 años, por otra parte se observó que la prevalencia del asma en mujeres (6.2%) en el grupo de edad de los 16.3 años fue significativamente mayor que la de los hombres (4.3%), pero no fue significativo cuando se relacionó con los niveles de IgE y el flujo espiratorio forzado (FEF), lo que nos muestra que si bien no existe una

relación directa entre el inicio de la pubertad, si hay un aumento de la prevalencia del asma.²³ En otro experimento en donde trataban de explicar por qué existe una mayor proporción de mujeres adultas con asma no alérgico, en el cual concluyó que las mujeres tienen un 20% mayor de riesgo para desarrollar asma no alérgico con edades superiores a los 35 años, por el contrario en el asma alérgico no se encontró alguna asociación²³.

Las hormonas han sido asociadas con el desarrollo de asma en la pubertad, principalmente en mujeres, sin embargo no se ha podido explicar un claro mecanismo por otra parte en un estudio en el cual se dio seguimiento a grupos de niños y niñas de entre 13 a 15 años por cuatro años, en los que se observó que algunos problemas de salud (tabaquismo y obesidad) aunados al género pueden ser propiciar el desarrollo de sibilancias, se concluyó que el tabaquismo en las mujeres incrementa significativamente las sibilancias (OR=2.8) con un IC de 95% y sibilancias estables estuvieron significativamente asociadas con el sobrepeso (OR=2.4) con un IC de 95%, los cuales no fueron similares en los niños tabla 1²⁴.

Tabla 1 asociación entre estilos de vida y el inicio y seguimiento de sibilancia en modelo de regresión separado, OR ajustado con 95% IC estratificado por sexo. Cuadro traducido y modificado de Elin Tollenfsen, et al. Género femenino asociado con alta incidencia y los síntomas respiratorios más estables durante la adolescencia. 2006

tabla 3 Asociación entre el factor de estilo de vida al inicio y las sibilancias actuales, un seguimiento en modelos de regresión separados, odds-ratio ajustado con IC del 95% estratificado por sexo								
factores de estilo de vida al inicio	sin síntomas respiratorios al inicio y sibilancias al momento del seguimiento				Sibilancias actuales tanto al inicio como en el seguimiento.			
	mujeres n= 724		hombres n=753		mujeres n=348		hombres n=197	
	OR*	95% IC	OR*	95% IC	OR*	95% IC	OR *	95% IC
Tabaquismo	2.8	(1.6-4.9)	1.8	(0.9-3.9)	1.3	(0.7-2.3)	1.7	(0.6-4.5)
Tabaquismo ambiental	1.3	(0.9-1.9)	1.8	(1.1-2.9)	0.8	(0.5-1.3)	1.7	(0.9-3.1)
sobre peso	1.1	(0.6-2.0)	1.0	(0.5-2.0)	2.4	(1.3-4.6)	1.1	(0.5-2.3)
baja actividad física	0.9	(0.6-1.3)	1.0	(0.6-1.8)	0.9	(0.6-1.6)	0.9	(0.4-2.0)

***ajustado por el consumo de tabaco actual, tabaquismo ambiental y la baja actividad física, y el sobrepeso medido al inicio del estudio.**

2.5 Cambios morfológicos o funcionales en las vías respiratorias

En el asma por ser un proceso inflamatorio que se lleva a cabo en las vías respiratorias se puede llegar a modificar la estructura de las mismas, esto es causado por varios tipos de células y sus mediadores como las células cebadas, eosinófilos activados, linfocitos T con perfil de citocinas de TH2, los cuales provocan despegamiento epitelial, hipertrofia e hiperplasia del músculo liso bronquial, hipertrofia de glándulas mucosas y fibrosis subepitelial, conjuntamente es llamado remodelación de la vía aérea, además se observa en mayor medida en la población pediátrica. En algunos estudios se observó que había un aumento de linfocitos y eosinófilos en la vías aéreas de pacientes asmáticos, además de un incremento en el número de células con ARNm de algunas interleucinas como la IL-4 e IL-5²⁷.

Este proceso se lleva en dos etapas:

1. La regeneración del parénquima dañado para restablecer la estructura y funcionamiento normal del tejido.
2. El reemplazo del tejido dañado por tejido fibroconectivo, el cual puede o no ser funcional.

La remodelación de la vía aérea tiene como resultado el estrechamiento de la misma, y además de un empeoramiento de los síntomas clínicos en el asma. Este proceso se ha visto involucrado con algunos genes, aunado a la historia familiar y los factores ambientales²⁸.

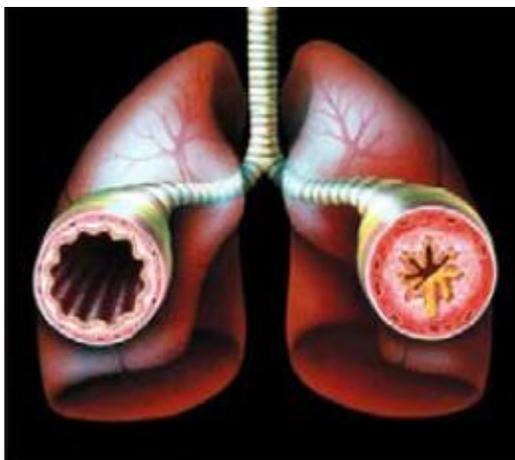


Figura. 2 Representación de la vía aérea en un pulmón sano (izquierdo) y en el asma (derecho). Tomado de Dr. José Huerta López. Asma, Alergia e inmunología. 2009²⁸.

Actualmente, se han identificado cerca de 120 genes que han sido implicados en la remodelación de la vía aérea, de los cuales los más representativos son los pertenecientes a la familia de genes ADAM, las cuales son proteínas de superficie celular que funcionan como mediadores de la adhesión y proteólisis en el epitelio respiratorio, se ha identificado el SNP de ADAM33 que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 20, como predictor de la obstrucción del flujo de la vía aérea²⁸.

2.6 Microorganismos

Los microorganismos son un factor importante en el desarrollo de enfermedades inflamatorias, es por eso que una gran variedad de microorganismos al entrar en el hospedero generan respuestas inmunes a través de características propias (patogenicidad) del microorganismo y dependiendo del efecto adverso que éste cause en el hospedero (virulencia) es como se desarrollará una infección por dicho microorganismo y que puede dejar susceptible al hospedero o alterar las población

de microorganismos del hospedero y de alguna manera propiciar otra enfermedad. Existe evidencia de que la alteración en la población microbiana tanto del tracto respiratorio como del digestivo pueden aumentar el riesgo de desarrollar enfermedades inflamatorias, por ejemplo *Helicobacter pylori* es una bacteria comensal que se encuentra en más de la mitad de la población mundial, además de favorecer un cuadro inflamatorio crónico²⁹. Por otra parte la infección por *H. pylori* la cual se ha observado que tiene una relación inversa con el desarrollo de asma infantil y alergias, sin embargo, es conocida como un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico^{30,31}.

Existen otros microorganismos que se encuentran implicados con el desarrollo de asma como es el caso del *Staphylococcus aureus*, en el cual sus enterotoxinas actúan como un superantígeno lo que aumenta el riesgo de desarrollar asma o exacerbarlo, esto se debe a que provoca que el epitelio de las vías respiratorias se degrade, lo que provoca un cambio en su estructura y finalmente un alteración en la funcionalidad de las células promoviendo la producción de citocinas que induzcan la respuesta inmune³².

2.7 Genéticos

Los factores genéticos comúnmente se asocian a muchas enfermedades, como son la diabetes, cáncer, enfermedades metabólicas, enfermedades autoinmunes, entre otras, de las cuales el asma es una de ellas, por esto es un área de amplia investigación asociando el riesgo de desarrollar dichas enfermedades a algún factor genético.

Una de las alteraciones genéticas posibles y que están asociadas a las enfermedades ya mencionadas están relacionadas a los polimorfismos de un solo nucleótido SNP (*Single Nucleotide Polymorphism por sus siglas en ingles*), los cuales son variaciones de uno de los nucleótidos de genes que integran el ADN. Estos SNP se han asociado con diferentes tipos de enfermedades y se pueden clasificar en 3 tipos:

El primer tipo de polimorfismos son los SNPs reguladores (rSNP) que se encuentran en las regiones promotoras de genes, los cuales tienen la función de sintetizar proteínas y de esta manera afectan los niveles de expresión por otra parte, los SNP estructurales (srSNP) se encuentran en los ARNm primarios (con intrones) y secundarios (sin intrones), que incluyen regiones no traducibles (5'UTR y 3'UTR), regiones intrónicas y codificantes, lo que genera una alteración en la estructura y función de los ARN, que incluyen el corte y empalme, la regulación en la traducción de los ARNm a proteínas, la funcionalidad de las proteínas y la estabilidad de los ARNm, y por último los SNP codificantes (cSNP) los cuales se localizan en los exones, y pueden o no cambiar el tipo de aminoácido que sea traducido dependiendo del cambio y por lo tanto, están involucradas en el desarrollo de patologías multifactoriales Figura 3³³.

Las últimas investigaciones que se realizan la búsqueda de la posible explicación por la cual se desarrolla la enfermedad como alteraciones genéticas en mediadores inflamatorios, receptores celulares y además, posibles marcadores genéticos que puedan dar un diagnóstico previo al desarrollo de asma.

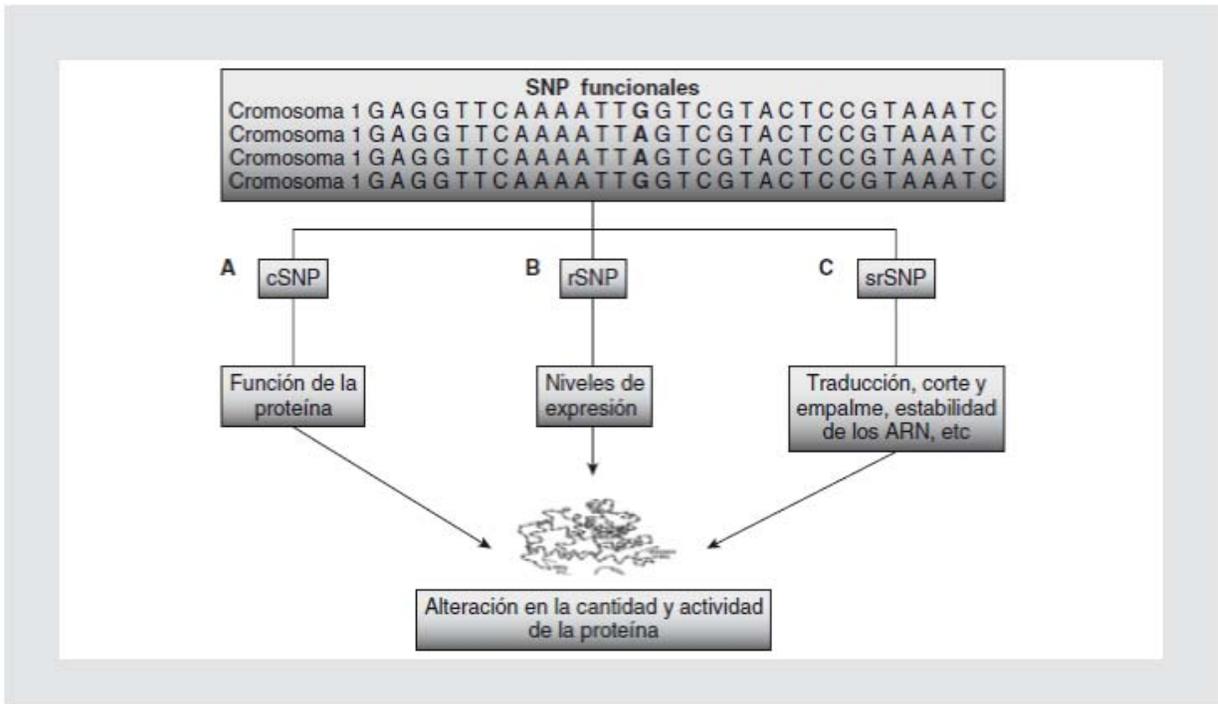


Figura 3. Clasificación de los SNP funcionales. Los SNP funcionales se dividen en tres grupos: a) los cSNP sinónimos (el nucleótido no cambia aminoácido) y no sinónimos (el nucleótido cambia aminoácido) que se encuentran en los exones (véase texto); b) en rSNP si afectan a la expresión génica, y c) los srSNP si afectan a la estructura y función de los ARNm de genes que sintetizan proteínas.³³

2.8 FÁRMACOS

En los últimos años se ha observado que existe un mal uso de los medicamentos por parte de la población, es el caso de los antibióticos que se administraban de manera no controlada ya que no se necesitaba una receta médica para adquirirla antes del año 2010, esto provocó resistencia a los antibióticos por parte de los microorganismos, otro ejemplo que ha llamado la atención es el que ha originado la aspirina pues se ha observado que afecta al 10% de la población asmática aunque este porcentaje puede ser mayor, y la prevalencia es por arriba del 10%, la cual se conoce como Enfermedad Respiratoria Exacerbada por la Aspirina (EREA) antes

llamada como síndrome de Fernand-Vidal, la cual se caracteriza por poliposis nasal, asma e hipersensibilidad al Ácido Acetil Salicílico (AAS) y a otros antiinflamatorios no esteroideos^{34,35,36,37,38,39}. Este tipo de asma es 2.3 veces más frecuente en mujeres, el mecanismo por el cual actúa este síndrome aún no está del todo claro, pero se cree que existe anomalías en el mecanismo del ácido araquidónico que es importante para las funciones en el organismo; el efecto de la aspirina es principalmente en la inhibición de la enzima cicloxigenasa1, lo que provoca un cambio hacia la vía de la lipoxigenasa y se observa por la sobreproducción y liberación de leucotrienos C4, D4 y E4 los cuales han demostrado ser los mediadores inflamatorios con mayor potencia broncoconstrictora y que además producen hipersecreción de moco con edema en las vías aéreas^{34,35,38}.

2.9 células NK y Receptor NKG2

Las células NK son parte del sistema inmune innato y representan del 5 al 14% de las células mononucleares en sangre y son considerados linfocitos T granulados con respecto a su morfología, además de diferenciarse por sus moléculas de superficie CD16 y CD56, también son CD3- y CD19- lo cual las diferencia de las células T y B respectivamente. Estas células son esenciales para la eliminación de células tumorales en forma espontánea, en otras palabras, sin previa sensibilización, y constituye la primera línea de defensa del organismo contra patógenos principalmente contra virus^{40,41,42}.

Receptores y función

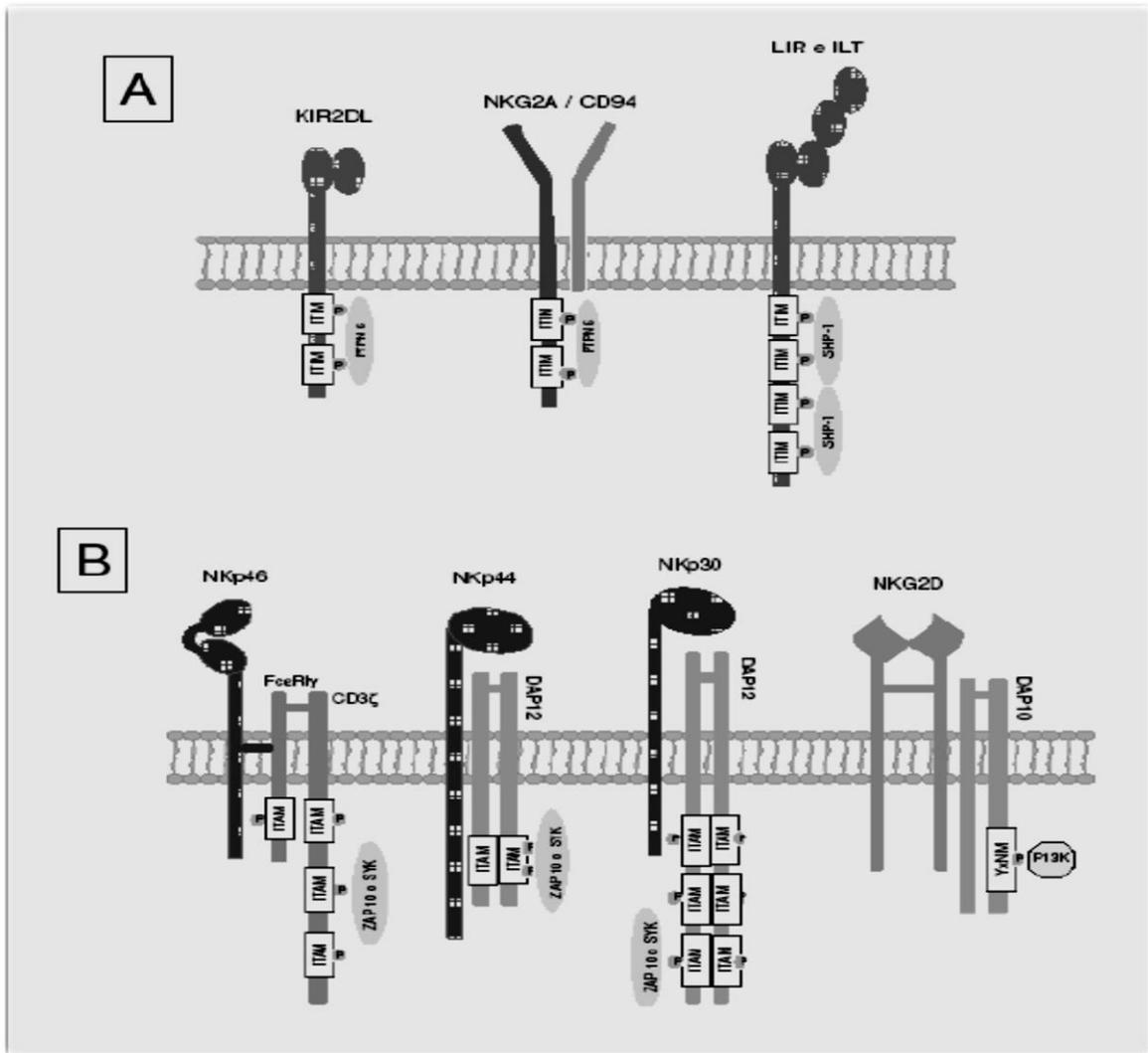
Las células NK presentan en su superficie celular moléculas que son receptores los cuales le permiten interactuar con otras células, siendo las principales los siguientes; receptores lectina tipo C, los cuales se subdividen en:

1) el heterodímero NKG2D/CD94 encargada de reconocer la molécula no clásica del complejo de histocompatibilidad, HLA-E.

2) los receptores de citotoxicidad natural (natural cytotoxicity receptor (NCR)) que son receptores activadores NKp30, NKp44 y NKp46 que son expresados sólo en células NK.

3) receptores de la familia de las inmunoglobulinas conocidos como killer inhibitory receptor (KIR) que son activadores e inhibidores y reconocen una disminución en la expresión de moléculas de HLA clase I.

4) receptor CD16 que reconoce células opsonizadas con anticuerpos IgG figura 5^{43,44}.



A. Figuras representativas de las principales familias de receptores inhibidores de las células NK, ilustrando la asociación de diferentes moléculas inhibitoras de la señalización intracelular a los dominios ITIM.

B. Figuras representativas de los principales receptores activadores de las células NK; estos receptores se asocian con diferentes moléculas adaptadoras ricas en dominios ITAM, que a la vez se asocian a moléculas citoplasmáticas encargadas de transmitir las señales activadoras.

ITIM: inmunoreceptores con motivos inhibitoras de tirosina; **ITAM:** inmunoreceptores con motivos activadores de tirosina; **ZAP:** Proteína asociada a la cadena zeta; **P:** proteína fosforilada en residuos de tirosina; **PTPN6:** Proteína no receptora fosfatasa de tirosinas tipo 6; **SHP-1:** Proteína fosfatasa de tirosinas citoplasmáticas; **SYK:** Cinasa de tirosinas citoplasmáticas; **PI3K:** Cinasa 3 de Fosfatidil Inositol.

Figura 4. Los diferentes tipos de receptores activadores e inhibidores en las células NK, imagen tomada de Moreno Fernández María Eugenia. Células NK: generalidades y papel durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH). *Lat reia* ;20: 2007

Los receptores NKG2 están presentes en la superficie de las células NK, en algunos subtipos de células T y en mastocitos activados, los cuales tienen funciones de activadores así como de inhibidores en el sistema inmune innato y adaptativo, dependiendo de la isoforma de NKG2 que se esté expresando en la célula.⁴⁵ La familia de receptores NKG2 en humanos comprende 7 miembros denominados NKG2-A, -B, -C, -D, -E, -F, y H siendo A/B y E/H variantes en el empalme de mismos genes.⁴⁵ Los miembros de esta familia comparten similitudes generales, como una secuencia de 24 aminoácidos, todos los miembros de esta familia son capaces de formar heterodímeros con enlaces disulfuro con una proteína llamada CD94, la cual es un receptor de las células NK tipo lectina.^{45,46} Las interleucinas producidas por la célula NK por medio de los receptores NKG2 están relacionadas con enfermedades alérgicas así como otras enfermedades por ejemplo el cáncer^{46, 47}.

3 Planteamiento del problema

El asma es una enfermedad crónica que afecta a más de 300 millones de personas en el mundo, convirtiéndose en una enfermedad de dominio público, por este motivo en México la incidencia que se ha reportado por la Secretaría de Salud es de 206,215 sólo en el año 2016, afectando mayormente a mujeres. Los principales factores de riesgo son partículas en el aire, fármacos, género, alimentos, genéticos, entre otros. La patogénesis del asma involucra la participación de células NK, las cuales inducen una respuesta de tipo Th2. Recientemente, se ha investigado el componente genético en el desarrollo de esta enfermedad, al respecto, existen trabajos donde se documenta la relación de SNPs presentes en genes de citocinas con el asma, sin embargo no se ha estudiado la relación que tienen SNPs en los genes de la familia de receptores NKG2 de la célula NK con el asma. Es por ello que al genotipificar los SNPs presentes en los genes de la familia de receptores antes mencionada se podría esclarecer un posible factor de riesgo además de comprender mejor el mecanismo por el cual las células NK favorecen la patogénesis del asma y convertirse en un biomarcador para su diagnóstico temprano.

Hipótesis

Los polimorfismos de un solo nucleótido de la familia de receptores NKG2 están asociados con el asma, alterando la función tanto del ARNm como la proteína que se traduce en dicha región, además de afectar la funcionalidad de las proteínas que integran los receptores NKG2 en una respuesta al ingerir ácido acetil salicílico en la enfermedad exacerbada al ácido acetil salicílico (EREA).

5 Objetivos

5.1 General

- Determinar que variante genética de cada uno de los SNPs de estudio pertenecientes a la familia de receptores NKG2 se asocia con el desarrollo de asma.

5.2 Particulares

- Genotipificar los alelos, genotipos y haplotipos de los SNP rs2617160, rs2617170, rs2617171, rs1049174, rs2255336, rs1983526, y rs2246809 de la familia de receptores NKG2 en un grupo control y en población de estudio.
- Determinar las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los SNP rs2617160, rs2617170, rs2617171, rs1049174, rs2255336, rs1983526, y rs2246809 en la población de estudio y controles.

6 Material y método

Tipo de estudio

- Casos y controles.

Universo de estudio

- Pacientes que presentan asma no alérgica en el subtipo de enfermedad respiratoria exacerbada a la aspirina, que acuden al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Población de estudio

- Se analizaron 239 pacientes con diagnóstico confirmado de EREA.

Grupo control

- Se incluyeron 215 individuos clínicamente sanos, provenientes de personas que acuden al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico confirmado de enfermedad respiratoria exacerbada a la aspirina.
- Pacientes con autorización para participar en el estudio mediante consentimiento informado por escrito.
- Ser mexicano con ascendencia de dos generaciones mexicanas o más.

- Masculino o femenino.

Criterios de exclusión

- Diagnóstico de alguna de las siguientes enfermedades: diabetes u espondiloartropatías.
- Diagnóstico de enfermedades autoinmunes.

Criterios de eliminación

- Muestra de sangre insuficiente.
- DNA degradado.
- Poca muestra de DNA al extraerla.

Variables

- Dependiente: enfermedad respiratoria exacerbada a la aspirina.
- Independiente: tipo de alelo de los SNPs de estudio rs2617160, rs2617170, rs2617171, rs1049174, rs2255336, rs1983526, y rs2246809.

Material biológico

Muestras de sangre periférica en tubos de EDTA para la obtención de DNA genómico por el método de *salting-out*.

Extracción de DNA

Se extrajo DNA genómico de pacientes y controles mediante la técnica de *salting-out*. Cada muestra se trató con una solución de lisis de glóbulos rojos que contienen sucrosa 0.3 M, TrisHCl pH 7.5 10 mM, MgCl₂ 5 mM y Triton 100X 1%, después, se centrifugó y se decantó el sobrenadante. Posteriormente se procedió a lisar los leucocitos con un buffer pH 8 (NaCl 0.075 M y Na-EDTA 0.024 M); además, se adicionó SDS al 20% y NaClO₄ 5 M, se agito algunos minutos y se agregó NaCl 5 M para separar el DNA de las proteínas. Se centrifugó y se recolectó, al cual se le adicionó isopropanol a -20°C para precipitar el DNA. El pellet obtenido se lavó con una solución de etanol frio al 70%, para resuspenderlo finalmente en agua inyectable.

Cuantificación e integridad de DNA

Las muestras de DNA extraídas fue analizada por medio del equipo NanoDrop ND 1000 con la finalidad de determinar la pureza del ADN a 260 nm y 280 nm de absorbancia y el cociente 260/280, el cual previamente se calibró con 1µL de agua como blanco. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron y con ayuda de una computadora y un software del equipo, en donde, nos mostraron los resultados para conocer su concentración y realizar las diluciones pertinentes posteriores.

La integridad de las muestras de DNA se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% a un voltaje de 125 voltios por 30 minutos.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiempo real

Una vez cuantificadas las muestras y los controles en el equipo NanoDrop 1000 se procedió a realizar las diluciones para obtener alícuotas que tuvieron una concentración de 20 ng/ μ L requeridas por la técnica.

Se realizó la preparación de la master mix siguiendo las indicaciones de la casa comercial *life technologies*.

Tabla 2 cantidades estandarizadas utilizadas en experimentos de PCR tiempo real de la casa comercial *life technologies*.

componente	volumen de reacción por pocillo (μ L)
Master Mix Taqman Universal PCR (2x)	12.50
Sonda SNP de ensayo (20x)	1.25
templado de DNA genómico (20 ng/ μ L) + agua libre de DNAsa	11.25
volumen total de mezcla de reacción	25.00

Los primers utilizados en la PCR en tiempo real para los SNPs de estudio son los siguientes:

Tabla 3. primers que son utilizados para el análisis de los polimorfismos correspondientes.⁻⁴³

polimorfismo	primer sentido	primer antisentido
rs2617160	ATGACTAATGTA AAAAGTAAAAAGTCTGCAAACA	GCCTTGAGTTCATATAAATTACAATACACCAGT
rs2617170	TGACAATCATAATGTACCTTTCTGCATTCT	CACTTTAATTTTCTAGGTATTGGAGTACTGGA
rs2617171	CCCAAGATAATATGCTGCTTCTGAAC	TCTCTTAAAACATGTCTTTGAGTCATGAAATCA
rs1049174	CTGCCCATGAGGCAATTTCC	GGATCAGTGAAGGAAGAGAAGGC
rs2255336	GAGGTATTTATGTTCTGTTCTGG	TCTACTTCTCTGTTGTCACCTAC
rs1983526	GGCCCTCTGAGGCACTAAATAG	CAGAGTGGGATCTTTGGTTCATGAT
rs2246809	ACCCCTAAGAGAAAAGGCTTTCATGTAC	ACTGGTCATTCTGTATTGCCTGTTT

Las sondas utilizadas en este estudio se encuentran en la siguiente tabla:

Tabla 4. Sondas utilizadas para PCR tiempo real de los polimorfismos correspondientes

polimorfismo	ensayo	sonda
rs2617160	C_1841959_10	CTATTTTCCATTCAGCTAGGTATTA[A/T]GTACTGGGCTACAC ATACTGACATA
rs2617170	C_1842497_10	CTGCATTCTTCTATTCAGGGAAAAA[C/T]TGTTCCTGCTCCAGT ACTCCAATACC
rs2617171	C_26984346_10	AGTCATGAAATCAGAATACATCTCT[C/G]TGTGTGTGTATCAT ATATACATATA
rs1049174	C_9345347_10	TGTGGAGGGTGGGGTTGCACTCTCA[C/G]TGATCTGCTGGCCT TCTCTTCCTTC
rs2255336	C_22274476_10	TTTAGGAATACAGCACTCCATATTG[C/T]TACCATAATAATGA AACGGATTCCC
rs1983526	C_11919464_10	TCCTTTTACTAGGGCTTCTAGCAGG[C/G]TTGTATCCTATTTAG TGCCTCAGAG
rs2246809	C_1842497_10	ACATAGCTATAAAATAAAAAACACAGT[A/G]TAATCTCCTGTGC ATTAATAAATTT

Una vez que se siguió las instrucciones de la casa comercial, se centrifugó y se colocó en el equipo de PCR tiempo real Applied Biosystem StepOne Plus. Se realizaron 40 ciclos (desnaturalización 95°C, alineación 68°C y elongación 72°C) por placa. Al término se observaron los resultados por medio de un software en una computadora la cual controla al equipo, que permitió observar el tipo de alelos de cada SNP al que pertenece cada paciente.

Análisis estadístico

Se procedió a calcular las medidas de tendencia central y de dispersión con la finalidad de determinar el tipo de distribución que poseen ambas poblaciones y posteriormente se utilizó un método estadístico para el análisis de los resultados

obtenidos. Se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg con el programa Haploview versión 4.2, así como las frecuencias alélicas y haplotípicas, por otra parte, las frecuencias genotípicas se realizaron por conteo directo.

Se realizó un análisis de asociación de las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas, mediante la prueba de *Ji-cuadrada*, finalmente, el valor de asociación entre los SNP's y la enfermedad se determinó con el cálculo de la OR (*Odds Ratio*) con un intervalo de confianza de 95% y un valor de $p < 0.05$, usando como herramienta el programa Epidat 3.1.

Aspectos éticos.

El presente trabajo está aprobado por los Comités de ética del Hospital de Pediatría "Dr. Silvestre Frenk Freund" del CMNSXXI (**R-2014-785-086**) y del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (B20-14).

El riesgo de la investigación es mínimo para los participantes en esta investigación, de acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. La población a estudiar serán pacientes adultos con Enfermedad Respiratoria Exacerbada a la Aspirina (EREA) y una población control. Todas las consideraciones que involucran a los participantes de la investigación vienen señaladas dentro de un consentimiento informado, descriptivo y detallado, que se le otorgará de manera escrita al posible participante, además de ser explicado personalmente.

En cualquier caso, se adoptarán las medidas necesarias para garantizar la integridad, confiabilidad, confidencialidad y disponibilidad de los datos personales,

así como de los resultados que se generen de este proyecto, mediante acciones que eviten su alteración, pérdida, transmisión y acceso no autorizado.

7. Resultados

La población de estudio estuvo conformada por 214 controles y 232 pacientes con diagnóstico de EREA siendo un total de 446 muestras, de las cuales 6 muestras fueron eliminadas (2 de controles y 4 de EREA), debido a que no cumplieron con los criterios establecidos en el estudio (tabla 5).

Tabla 5. Número de muestras totales vs número de muestras utilizadas en el estudio tanto para el grupo de EREA como el CONTROL

base de datos	Número de muestras totales	Número de muestras incluidas en el análisis
controles	214	212
EREA	232	228

se hizo el conteo por género en cada población y una Ji-cuadrada para observar que las variables de edades estuvieran asociadas, se contabilizaron 129 mujeres control (61%) y 153 mujeres en EREA (67%), por otra parte se contabilizaron 83 hombres control (39%) y 75 hombres en EREA (33%), además la prueba de Ji-cuadrada se obtuvo un valor p 0.172 y un IC de 95% siendo las poblaciones independientes (tabla 6).

Posteriormente se realizó un diagrama de tallo y hoja en el cual se observa con respecto a la edad, la distribución de la población control (figura 5) versus la distribución de la población de EREA (figura 6). Los resultados mostraron que las poblaciones de estudio poseen libre distribución, para la población control se calculó

la mediana, dando un valor de 30 años y sus percentiles 25 y 75 fueron de 23 a 40 años respectivamente, de igual manera para la población de EREA se calculó la mediana siendo de 42 años, además de los percentiles 25 y 75, fueron 35 a 49 años (tabla 7).

Posteriormente se realizó la prueba de U de Mann-Whitney, en la cual el valor de p de 0.001 con un IC de 95%, entendiéndose que no hay diferencias entre las poblaciones de estudio con base en sus medianas (tabla 8).

tabla 6. Prueba de Ji-cuadrada en el cual se observa la relación entre ambas poblaciones, número de controles y EREA por género

	control	EREA	Ji-cuadrada
sexo	n (%)	n (%)	valor de p
mujeres	129 (61%)	153 (67%)	0.172
hombres	83 (39%)	75 (33%)	total: 440

Tabla 7 valores estadísticos de tendencia central y distribución de las poblaciones EREA y CONTROL

poblaciones de estudio	MEDIANA (años)	PERCENTILES (25 y 75)
EREA	42	35-48
CONTROL	30	23-40

Tabla 8. Prueba de U de Mann-Whitney asociando las medianas de ambas poblaciones

valores estadísticos de edades de población control y EREA			
	control	EREA	U de Mann-whitey
	mediana (rango)	mediana (rango)	valor de p
edad (años)	30 (18-65)	42(15-71)	0.00

A continuación se calculó por medio del programa Haploview versión 4.2 el valor de p del equilibrio de Hardy-Weinberg en la población control (tabla 3), lo que nos indica que la población de estudio está en equilibrio.

Tabla 9 equilibrio de Hardy-Weinberg

rs SNP	valor de p equilibrio de Hardy-Weinberg
rs2617160	0.19
rs2617170	0.11
rs2617171	0.1
rs1049174	0.23
rs2255336	1
rs1983526	0.9
rs2246809	1

Frecuencias alélicas

Se obtuvo el tipo de alelo que presentó cada individuo y la suma total por tipo en las poblaciones control y EREA, con ese valor se determinaron las frecuencias alélicas para cada SNP de estudio de cada población. Los resultados con respecto a las frecuencias alélicas indican una elevada frecuencia de .9 para el alelo “G” en comparación con el alelo “A” que fue de .1 en el SNP rs2246809, un valor similar ocurrió con el polimorfismo rs2255336 en donde el alelo “C” presentó un valor su frecuencia de .9 comparado con el .1 del alelo “T”, estas frecuencias se presentaron tanto en la población control como en la población de EREA, sin embargo ningún valor fue significativo con la enfermedad (tabla 4).

Tabla 10 frecuencias alélicas de la población de EREA y controles

SNP	alelo	alelo ancestral	control n=212	pacientes n=228	OR	IC (95%)	Valor p
rs2617160	A	T	76(0.36)	90(0.4)	1.17	0.8-1.7	0.43
	T		136(0.64)	138(0.6)			
rs2617170	T	T	76(0.36)	96(0.42)	1.3	0.9-1.9	0.18
	C		136(0.64)	132(0.58)			
rs2617171	C	C	76(0.36)	94(0.41)	1.25	0.85-1.85	0.25
	G		136(0.64)	134(0.59)			
rs1049174	G	C	76(0.36)	92 (0.4)	1.21	0.82-1.8	0.33
	C		136(0.64)	136(0.6)			
rs2255336	T	G	18(0.09)	22(0.1)	1.15	0.6-2.2	0.67
	C		194(0.91)	206(0.9)			
rs1983526	G	C	106(0.5)	130(0.57)	1.33	0.91-1.93	0.14
	C		106(0.5)	98(0.43)			
rs2246809	A	A	18(0.09)	21(0.09)	1.1	0.57-2.1	0.79
	G		194(0.91)	207(0.91)			

Frecuencias genotípicas

Para obtener los resultados de las frecuencias genotípicas se tomaron en cuenta los resultados obtenidos del PCR en tiempo real, además se realizó una prueba de Ji-cuadrada realizada en el programa Epidat versión 3.1 para observar su asociación con la enfermedad.

Tabla 11 frecuencias genotípicas de la población de EREA y controles

SNP	genotipos	controles n=212	EREA n=228	OR	IC (95%)	valor p
rs2617160	AA	32(0.15)	34(0.15)	0.98	0.58-1.66	0.96
	AT	88(0.42)	113(0.5)	1.38	0.94-2.01	0.09
	TT	92(0.43)	81(0.35)	0.71	0.48-1.1	0.09
rs2617170	CC	93(0.44)	76(0.34)	0.64	0.43-0.94	0.02
	CT	87(0.41)	112(0.49)	1.38	0.95-2.0	0.09
	TT	32(0.15)	40(0.17)	1.2	0.72-1.98	0.49
rs2617171	CC	33(0.16)	36(0.16)	1.01	0.6-1.7	0.95
	CG	85(0.40)	116(0.51)	1.54	1.1-2.26	0.02
	GG	94(0.44)	76(0.33)	0.63	0.43-0.92	0.02
rs1049174	CC	91(0.43)	79(0.35)	0.7	0.5-1.04	0.08
	CG	89(0.42)	114(0.5)	1.38	0.95-2.01	0.09
	GG	32(0.15)	35(0.15)	1.02	0.61-1.71	0.94
rs2255336	CC	178(0.84)	189(0.83)	0.93	0.56-1.53	0.76
	CT	33(0.15)	34(0.15)	0.95	0.57-1.59	0.85
	TT	1(0.01)	5(0.02)	4.73	0.55-40.8	0.12
rs1983526	CC	54(0.25)	40(0.18)	0.62	0.4-0.99	0.04
	CG	104(0.5)	117(0.51)	1.1	0.75-1.59	0.64
	GG	54(0.25)	71(0.31)	1.32	0.87-2.0	0.19
rs2246809	AA	1(0.01)	5(0.02)	4.73	0.55-41.0	0.12
	AG	34(0.16)	33(0.14)	0.89	0.53-1.5	0.65
	GG	177(0.83)	190(0.83)	0.99	0.6-1.6	0.96

Los resultados obtenidos en la prueba de Ji-cuadrada nos indica que el genotipo CG del SNP rs2617171 funcionaria como un factor de riesgo para el desarrollo de asma ya que presenta un OR de 1.54 con un IC 1.03-2.19 a 95% y valor de p 0.02 (tabla 5). Por otra parte, se observó dos genotipos cuyos valores indican que funcionarían como factores de protección, el primero pertenece al genotipo “CC” del SNP rs2617170 con un valor de OR de 0.64 e IC 0.43-0.94 al 95% y valor de p 0.02,

el segundo pertenece al genotipo GG del SNP rs2617171 con un valor de OR de 0.63 e IC 0.43-0.92 al 95% y valor de p 0.02 (tabla 5).

Frecuencias haplotípicas

Se determinaron los haplotipos que se forman con los SNP estudiados con el programa haploview versión 4.2, de acuerdo a un artículo (Hayashi et al.)⁴³, existen dos haplotipos en la región del gen NKG2D, que podemos nombrarlos para fines prácticos haplotipo 1 y haplotipo 2 fig. 5. Se observa en la tabla 6 las posibles combinaciones del haplotipo 1, los cuales están conformados por 4 SNP (rs1049174, rs2617160, rs2617170 y rs2617171), se observa que el primer haplotipo tiene un OR de 0.76 y un IC de 0.58 a 0.99 al 95% y un valor de p de 0.04 lo que indica fungiría como un factor de protección.

Tabla 12. Haplotipo 1. Haplotipos formados por 4 SNP (rs1049174, rs2617160, rs2617170 y rs2617171) obtenidas por el programa Haploview versión 4.2

haplotipo 1	frecuencia control n=212	frecuencia EREA n=228	OR	IC 95%	valor P
CTCG	0.64(136)	0.57(130)	0.76	0.58-0.99	0.04
GATC	0.35(74)	0.4(91)	1.2	0.92-1.58	0.18

Por el contrario el segundo haplotipo no mostro ser significativo con la enfermedad.

El haplotipo 2 que está integrado por 2 SNP (rs2255336 y rs2246809) no presentó ninguna asociación con la enfermedad.

Diabetes tipo 2 (DMT2), así como enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso generalizado (LEG) y artritis reumatoide (AR).

El asma en edades tempranas es prevalente en varones, sin embargo esto se ve invertido en la edad adulta, y las mujeres tienden a una mayor prevalencia a desarrollar asma, sin embargo no se tiene una clara explicación de esto²³. En los resultados obtenidos en este estudio se observó que la mayoría fueron mujeres para ambas poblaciones de estudio con el 61% en la población control y un 67% para la población de EREA (tabla 6), además las medianas de edades en las que se observó una mayor prevalencia en la población de mujeres de EREA fue de una edad de 40 años, por el contrario en la población control se observó una mediana de 30 años, estos resultados son similares a las conclusiones de estudios que reportan que a edades superiores de 35 años en mujeres incrementa la incidencia de EREA sin embargo, las diferencias sexuales son un factor independiente para el asma no alérgico^{23,24}. Por otra parte, el desarrollo de los pulmones en la niñez y hasta la pubertad que influyen en la vida adulta, la predisposición genética, las hormonas sexuales principalmente el estrógeno y la progesterona y, comorbilidades como es la obesidad, que pueden dar hincapié al desarrollo del asma.²⁰

Los resultados de las frecuencias alélicas no mostraron ninguna asociación con la enfermedad (tabla 10) por otra parte, en las frecuencias genotípicas se observó tres genotipos que tuvieron asociación con la enfermedad (tabla 11) además, cabe mencionar que los genotipos asociados pertenecen a dos polimorfismos de un solo nucleótido, (rs2617170 y rs2617171) los cuales conjuntamente presentan

desequilibrio de ligamento debido a su proximidad entre ellos en el gen, además estos polimorfismos pertenecen a la familia de receptores NKG2 del tipo D (NKG2D), lo que implica una alteración en la función de las células NK, específicamente en la identificación de antígenos (HLA), los datos muestran que pueden realizarse estudios para determinar el mecanismo por el que estos polimorfismos afectan la respuesta inmune con respecto a la función de la célula NK y los receptores implicados, un estudio realizado en Hiroshima Japón implicó a estos SNPs (rs2617170 y rs2617171) con una alta actividad citotóxica en linfocitos de sangre periférica y su asociación con el desarrollo de cáncer y a la vez está asociada con la funcionalidad de las células NK. Por último, los resultados de frecuencias haplotípicas mostraron que existe la formación de dos haplotipos, el primero llamado haplotipo 1 está integrado por 4 SNP (rs1049174, rs2617160, rs2617170 y rs2617171), el cual presenta dos alelos, el primer haplotipo "CTCG" con un OR de 0.76 con un IC 0.58-0.99 al 95% y un valor de p de 0.04 fungiría como un factor de protección, el otro alelo no fue significativo con la enfermedad; por otra parte el haplotipo 2 no presentó ninguna asociación con la enfermedad, en el estudio de Hiroshima se identificó un haplotipo con alta actividad citotóxica con los mismos SNPs de este estudio, el cual se emparejó con otros haplotipos de baja y alta actividad citotóxica para su asociación con el cáncer, los resultados mostraron un OR de 0.471 con un IC del 95% .

Finalmente, es imprescindible mencionar que anteriormente, se pensó que el efecto del ácido acetil salicílico (AAS) en el asma era un mecanismo de tipo alérgico, sin embargo su mecanismo no es del tipo alérgico, sino que el efecto es a través de la

alteración de las prostaglandinas (PG), específicamente la prostaglandina E (PGE) la cual tiene un efecto antiinflamatorio y que está disminuida en pacientes con EREA. Por otra parte las personas con esta enfermedad se ha observado que están incrementados los broncoespasmos y los niveles de leucotrienos son superiores a nivel bronco alveolar y orina comparado con la población asmática y la población en general.³⁴

Integrando lo ya dicho, el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs2617170 en este estudio elevó el riesgo de desarrollar asma, además, la ingesta de ácido acetil salicílico puede exacerbar en personas asmáticas su condición y aunado a su género son los puntos más importantes a destacar. Por último, el efecto del AAS está directamente asociado a elevar los niveles de leucotrienos que son mediadores de la inflamación y que aumentan la permeabilidad vascular lo que facilita a las células del sistema inmune, como son las células NK, que al llegar a las vías respiratorias estas células a través de sus receptores NKG2 inician una respuesta inmune en las vías respiratorias por el incremento de leucotrienos. De manera que la alteración por parte del SNP puede contribuir con este efecto al liberar mediadores inflamatorios y sus efectos sean manifestados con los síntomas del estado asmático, además puede funcionar como un biomarcador para un diagnóstico previo a que se origine la enfermedad

9. Conclusión

El genotipo CG del SNP rs2617171 perteneciente a la familia de receptores NKG2 está asociado como factor de riesgo para desarrollo de asma, por otra parte los genotipos CC (rs2617170) y GG (rs2617171) están asociados como factor de protección para el enfermedad aunado al haplotipo formado, los cuales pueden considerarse al mecanismo de la enfermedad, además de poder ser biomarcadores para diagnóstico de EREA.

10. perspectivas

Los polimorfismos de un solo nucleótido que están presentes en la región de la familia de receptores NKG2 localizado en el cromosoma 12, mostraron una asociación significativa con la enfermedad. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para conocer los mecanismos de esta enfermedad, como de expresión y secuenciación de regiones polimórficas y observar los efectos de proteínas usando marcadores. Finalmente, poder realizar una teoría con base en los resultados obtenido para explicar el mecanismo más probable por el cual se origina el asma inducido por el AAS

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud OMS [citado 18 jun 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/es/>
2. Velavati Ashraf, Alireza Hosseini Seved, Akbari Sari Ali, Mohtasham Farideh, Ghanei Mostafa, Yaqhoubi Mohsen, et al. Comparison of the effectiveness and safety of formoterol versus salmeterol in the treatment of patients with asthma: A systematic review and meta-analysis. *J Res Med Sci.* 2015; 20(5): 483–490.
3. Farhadi Nazanin, Lambert Laura, Triulzi Chiara, J.M. Peter, Guerra Nadia, J. Cullev Fiona. Natural killer cell NKG2D and granzyme B are critical for allergic pulmonary inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 133(3): 827–835.
4. Granados Nambo José Ignacio. Evaluación de la expresión del factor de transcripción inducible en hipoxia 1 en células de pacientes pediátricos con asma: implicaciones clínicas.[tesis]. Cuautitlán Izcalli Estado de México: UNAM; 2015.
5. Jarquin Hernández Selma. Factores de riesgo asociados a enfermedades alérgicas y asma durante el primer año de vida en niños menores de 10 años.[tesis]. Hospital Regional de Alta Especialidad del Niño “Dr Rodolfo Nieto Padrón”: Instituto de Asistencia, Enseñanza e Investigación Secretaria de Salud del Estado, UNAM; 2012.
6. Del Rio Navarro Blanca Estela, Hidalgo Castro Emilia María, Sierra Monge Juan José Luis. Asma. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2009; 66: 3-33.
7. Albarrán Juárez Sandra Luz. Relación entre los factores de riesgo para el desarrollo de asma y el nivel de control en los pacientes que acuden a la consulta externa de alergia e inmunología en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”[tesis]. Hospital Infantil de México “Federico Gómez”: UNAM; 2014.
8. Quintero Martínez Marco Antonio. Factores de riesgo, diagnóstico y tratamiento de asma.[tesis licenciatura]. Universidad Westhill: Hospital Fernando Quiroz.
9. Pazmiño Freddy Alexander, Navarrete Jiménez Myriam Lucía. Mecanismos Inmunológicos implicados en la patología del asma alérgica. *Rev. Fac. Med.* 2014; vol 62 (2): 265-277.
10. Alvarado González Alcibey, Arce Jiménez Isabel. Mecanismos de acción y de Resistencia a glucocorticoides en asma y en enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Acta méd costarric; vol 55 (4): 162-168.*
11. Ramos Barbón David, Parra Arrondo Antonio. Inflamación y remodelación de la vía aérea pequeña: estudios en humanos y modelos experimentales. *Arch Bronconeumol.* 2011; 47 (2): 2-9.
12. García de la Rubia S, Pérez Sánchez S. Asma: concepto, fisiopatología, diagnóstico y clasificación. *Pediatr Integral* 2012; 16(2): 117-130.

13. Sannette Hall, Devendra K. Agrawal. Key Mediators in the Immunopathogenesis of Allergic Asthma. *Int Immunopharmacol.* 2014; 23(1): 316–329
14. Cardenas M., Vallejo M., Romano Riquer P., Ruiz Velazco S., Ferreira Vidal AD., Hermosillo AG. Personal exposure to PM2.5 air pollution and heart rate variability in subjects with positive or negative head-up tilt test. *Environ Res.* 2008;108(1):1-6.
15. Miguel Pérez Gabriela, Maya Griselda, Flores Márquez Ana Rosa, Amador Muñoz Omar, Villalobos Petrini Rafael, Eguía Aguilar Pilar. Et al. Efectos de la contaminación del aire en células humanas de pulmón. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2013;70(2):107-115.
16. Sánchez Jorge, Caraballo Luis. Repercusión de la contaminación del aire en la aparición de asma. *Rev Alerg Mex.* 2015; 62: 287-301.
17. Poynter Matthew E., Persinger Rebecca L., Charles G. Irvin, Butnor Kelly J., Van Hirtum Hans, Blay Wendy. Et al. Nitrogen dioxide enhances allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 290: L144-L152.
18. Fakhrzadeh Ladan, Laskin D. Jeffrey, Laskin L. Debra. Ozone-induced production of nitric oxide and TNF- α and tissue injury are dependent on NF- κ B p50. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 287: L279-L285.
19. Shau-Ku Huang, Qingling Zhang, Zhiming Qiu, Kian Fan Chung. Mechanistic impact of outdoor air pollution on asthma and allergic diseases. *J Thorac Dis.* 2015; 7 (1): 23-33.
20. Cochrane A. Stella, Arts H.E. Josje, Ehnes Colin, Hindle Stuart, M. Hollnagel Heli, Poole Alan, et al. Thresholds in chemical respiratory sensitization. *Toxicology.* 2015; 333: 179-194.
21. Townsend Elizabeth A., Miller Virginia M., Prakash Y.S. Sex Differences and Sex Steroids in Lung Health and Disease. *Endocrine Reviews.* 2012; 33 (1): 1-47.
22. Vink Nienke M., Postma Dirkje S., Schouten Jan P., Rosmalen Judith G. M., Marike Boezen H. Gender differences in asthma development and remission during transition through puberty: the Tracking Adolescents' Individual Lives Survey (TRAILS) study. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 126 (3): 498-504.
23. Leynaert Bénédicte, Sunyer Jordi, García Esteban Raquel, Svanes Cecilie, Jarvis Deorah, Cerveri Isa, et al. Gender differences in prevalence, diagnosis and incidence of allergy and non-allergic asthma: a population-based cohort. *Thorax.* 2012; 67: 625-631.
24. Tollefsen Elin, Langhammer Arnulf, Romundstad Pål, Bjermer Leif, Johnsen Roar, Holmen Turid L. Female gender is associated with higher incidence and more stable respiratory symptoms during adolescence. *Respiratory Medicine.* 2007; 101: 896–902.
25. Raghavan Deepa, Jain Raksha. Increasing awareness of sex differences in airway diseases. *Respirology.* 2015: 1-11.

26. Almqvist C., Worm M., Leynaert B. grupo de trabajo de GALEN WP 2.5 Gender. Impact of gender on asthma in childhood and adolescence: a Ga²LEN review. *Allergy* 2008; 63: 47–57.
27. Ramos Barbón David, Parra Arrondo Antonio. Inflamación y remodelación de la vía aérea pequeña: estudios en humanos y modelos experimentales. *Arch Bronconeumol.* 2011; 47 (2): 2-9.
28. Huerta López José, Jiménez Gutiérrez Carlos, del Olmo Téllez Horacio, Maza López Miguel. Remodelación de la vía aérea en asma. Huerta LJ y col. 2009; 18 (2): 60-78.
29. Rosales Hortiales Esteffy. Polimorfismos de un solo nucleótido de IL-6 en cáncer gástrico [tesis]. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza: UNAM; 2015.
30. Iizasa Hisashi, Ishihara Shyunji, Richardo Timmy, Kanehiro Yuichi, Yoshiyama Hironori. Dysbiotic infection in the stomach. *World J Gastroenterol* 2015; 21(40): 11450-11457.
31. Sehrawat Anjna, Sinha Siddharth, Saxena Abhishek. *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein: a potential Treg modulator suppressing allergic asthma?. *Frontiers in Microbiology.* 2015; 6: 1-6.
32. Huang Yvonne J., Boushey Homer A. The microbiome in asthma. *J allergy clin immunol.* 2015; 135: 25-30.
33. Ramírez Bello Julián, Vargas Alarcón Gilberto, Tovilla Zárate Carlos, Frago José Manuel. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gac Med Mex.* 2013; 149: 220-228.
34. Fuentes Beltran A., García Cruz M., Terán Juárez L. Enfermedad respiratoria exacerbada por ácido acetilsalicílico. Fuentes BA y col. 2004; 13 (3): 99-103.
35. Vallano Antonio, Pedrós Consuelo. Asma inducida por ácido acetilsalicílico. *Med Clin (Barc).* 2001; 117: 274-275.
36. De García J., Carne X., Morell F., Laporte J.R. Asma inducido por ácido acetilsalicílico, otros antiinflamatorios no esteroideos y tartrazina. *Arch Bronconeumol* 1986; 21:140-144.
37. Gandhi F Pavón-Romero, Juan M Reséndiz-Hernández, Fernando Ramírez-Jiménez, Gloria Pérez-Rubio, Ángel Camarena, Luis M Tera'n, Ramcés Falfán-Valencia. Single nucleotide polymorphisms in *TNF* are associated with susceptibility to aspirin-exacerbated respiratory disease but not to cytokine levels: a study in Mexican mestizo population. *Biomark.Med.* 2017; 11(12): 1047–1055.
38. Andrew A. White, M.D., Taylor A. Doherty, M.D. Role of group 2 innate lymphocytes in aspirin-exacerbated respiratory disease pathogenesis. *Am J Rhinol Allergy.* 2018; 32: 7-11
39. Hun Soo Chang, Jong Sook Park, Ho Sung Lee, Jiwon Lyu, Ji-Hye Son, Inseon S. Choi, Hyoung Doo Shin†, Choon-Sik Park. Association analysis of ILVBL gene polymorphisms with aspirin-exacerbated respiratory disease in asthma. Chang et al. *BMC Pulmonary Medicine.* 2017; 17:210.

40. Hayashi Tomonori, Imai Kazue, Morishita Yukari, Hayashi Ikue, Kusunoki Yoichiro, Nakachi Kei. Identification of the NKG2D Haplotypes Associated with Natural Cytotoxic Activity of Peripheral Blood Lymphocytes and Cancer Immunosurveillance. *Cancer Res.* 2006; 66(1): 563-570.
41. Serrano Hernández Antonio. Celulas colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatol Clin.* 2009; 5 (1): 1–5.
42. Vega Robledo Gloria Bertha. Linfocitos. *Rev Fac Med UNAM.* 2009; 52 (6): 276-277.
43. Moreno Fernández María Eugenia, Montoya Guarín Carlos Julio, Rugeles López María Teresa. Células NK: generalidades y papel durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). *IATREIA.* 2007; 20 (1): 47-63.
44. Taborda Natalia A., Hernández Juan C., Montoya Carlos J., Rugeles María T. Las células natural killer y su papel en la respuesta inmunitaria durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1. *inmunología.* 2014; 33 (1): 11–20.
45. Gunturi, A., Berg R. E. & Forman, J. The role of CD94/NKG2 in innate and adaptive immunity. *Immunol Res* (2004); 30(29): 29-34
46. Brostjan C., Sobanov Y., Glienke J., Hayer S., Lehrach H., Francis F., et al. The NKG2 natural killer cell receptor family: comparative analysis of promoter sequences. *Genes and Immunity.* 2000; 1: 504–508.
Plougastel, B. and Trowsdale, J. Cloning of *NKG2-F*, a new member of the *NKG2* family of human natural killer cell receptor genes. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27: 2835–2839.

Apéndice 1

Teorema de Hardy-Weinberg

El principio de Hardy-Weinberg (PHW) lleva el nombre del matemático inglés G.H. Hardy y el físico alemán Wilhelm Weinberg que establecieron el teorema de forma independiente en 1908 y es utilizado en genética de poblaciones, la cual establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio siempre y cuando la población sea suficientemente grande, de apareamiento aleatorio (panmixia), en ausencia de mutación, migración y selección.

Las condiciones para que exista equilibrio de Hardy-Weinberg se enlistan a continuación.

- Apareamiento aleatorio. El Teorema de Hardy-Weinberg establece que la población tendrá las frecuencias esperadas tras una generación de apareamiento aleatorio dentro de la población, si existe una violación a esta condición la población no en equilibrio.
- Selección. Regularmente esta condición hace que cambien las frecuencias alélicas y dependiendo el tipo de selección pueden desaparecer alelos excepto el favorecido o mantenerlos.
- Mutación. Tiene efectos sutiles en las frecuencias alélicas, dependiendo el tipo de mutaciones que puedan originarse, los ritmos de mutación son del orden de 10^{-4} a 10^{-8} y la variación de las frecuencias alélicas son de menor o igual orden a las de mutación.
- Migración. Enlaza genéticamente a dos poblaciones, en las cuales las frecuencias alélicas se volverán más homogéneas entre las dos poblaciones.

Teniendo en consideración las condiciones anteriores, para la aplicación estadística de este teorema, se debe tomar en cuenta que los alelos de la siguiente generación de un individuo se seleccionan de manera aleatoria e independientemente unos de otros, supongamos dos alelos "A" y "a" con frecuencias en la población "p" y "q"

respectivamente, para obtener los nuevos genotipos se utiliza un cuadro de punnet, siendo la fracción de cada celda el producto de las probabilidades de las filas y columnas $(A+a)^2$.

		mujeres	
		A	a
hombres	A	AA	Aa
	a	Aa	aa

Las frecuencias genotípicas posibles son las siguientes.

$$AA= p^2$$

$$Aa= 2pq$$

$$aa= q^2$$

Estas frecuencias son también llamadas frecuencias de Hardy-Weinberg.

Frecuencias Alelicas

Las frecuencias alélicas se pueden calcular con las siguientes formulas.

$$p = P + H/2$$

y

$$q = Q + H/2$$

Donde

p es la frecuencia alélica de un genotipo.

y q es la frecuencia alélica del otro alelo del mismo genotipo.

El valor de las frecuencias alélicas que se calcula con las anteriores formulas son sustituidas en cada una de las frecuencias de Hardy-Weinberg de tal manera que se obtienen los valores esperados (E) para cada frecuencia, además se debe utilizar los valores que se obtuvieron de resultados en el experimento, a los que llamaremos valores obtenidos (O) y Se realiza una prueba de Chi-cuadrada de Pearson.

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

La finalidad es comprobar que los datos obtenidos en las frecuencias genotípicas en el estudio sean significativos, teniendo en cuenta que hay un grado libertad, el valor de significancia correspondiente es 3.84.