



U. N. A. M.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

**Identificación de un perfil genético asociado a
inflamación y daño al DNA como factor de riesgo
a Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
(EPOC)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Biología experimental)

P R E S E N T A

Q. F. B. Juan Manuel Reséndiz Hernández

Tutor Principal de Tesis: Dr. Ramcés Falfán-Valencia

Comité Tutor: Dra. Martha Esthela Pérez Rodríguez
Dra. Ana María Salazar Martínez

MÉXICO, D. F.

Agosto de 2011



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **RESÉNDIZ HERNÁNDEZ JUAN MANUEL** con número de cuenta **510007915** con la tesis titulada **"IDENTIFICACIÓN DE UN PERFIL GENÉTICO ASOCIADO A INFLAMACIÓN Y DAÑO AL DNA COMO FACTOR DE RIESGO A EPOC"**, realizada bajo la dirección de la :
DR. RAMCÉS FALFAN VALENCIA

Presidente:	DRA.	LAURA COLÍN BARENQUE
Vocal:	DRA.	VILMA MALDONADO LAGUNAS
Secretario:	DRA.	MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ
Suplente:	DR.	ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO
Suplente:	DRA.	ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 02 de agosto de 2011

M. del Coro Arizmendi

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por haberme permitido continuar con mi preparación académica.

Al CONACYT: Por haberme proporcionado el apoyo económico que me permitió concluir el posgrado; número de becario: 233765.

Al Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (FOSIS) por el apoyo otorgado para la realización de la presente tesis, la cual es parte del proyecto: SALUD-2008-C01-87380.

III

Al Dr. Ramcés Falfán-Valencia: Por haberme guiado y apoyado incondicionalmente como tutor principal durante el posgrado.

A las Dras. Ana M. Salazar M. y Martha E. Pérez R. que fungieron como comité tutor, y sus exigencias motivaron mi crecimiento.

Agradecimientos

A los miembros de mi jurado de grado, Dra. Laura Colín, Dra. Vilma Maldonado, Dra. Martha E. Pérez, Dr. Rogelio Hernández y Dra. Ana M. Salazar, por las valiosas observaciones realizadas a este trabajo que contribuyeron a hacerlo mejor.

A la UNAM, por haberme admitido y ser parte de desarrollo académico-profesional.

IV

Al Q.F.B. Ángel Eduardo Camarena, por permitirme desarrollar este proyecto en el laboratorio a su cargo, además de su apoyo incondicional.

A la Dra. Alejandra Ramírez V. y al Dr. Raúl Sansores Mtz. y sus grupos de trabajo por su enorme apoyo brindado para con esta tesis.

Agradecimientos Personales

A mis padres, Su ejemplo es el mayor legado que me han dejado, y es por eso que aun hay muchos más pasos por dar, GRACIAS.

A mi amada esposa, Laura: por que este arduo camino, hubiera sido imposible de recorrerlo si no lo hubieras recorrido a mi lado, gracias por tu enorme apoyo y comprensión: TE AMO.

A mi princesa, Paola: Hija, aunque aún eres muy pequeña para comprenderlo, pero cada paso que doy, desde tu llegada, eres tu la principal motivación. Te amo, mi hermosa princesa.

A mi hermano, José E., por que se que por escalón subido, Tú lo superaras muchas mas veces. Te quiero hermano.

A mi amigo, Ramcés: Por haberme escuchado, aconsejado, ayudado y comprenderme durante estos dos años, por haberme tenido confianza pero sobre todo, por ser mi amigo. Muchas gracias.

A mis compañeros: Gloria, Aseneth, Luis, Octavio y Doroteo, pues además de ser mis amigos y compañeros, colaboraron y contribuyeron para que este trabajo haya sido concluido. Gracias.

Índice

I. Abreviaturas empleadas	VII
II. Siglas empleadas	VIII
1.0 Resumen	1
2.0 Abstract	3
3.0 Introducción	5
3.1 Epidemiología.....	5
3.2. Patogénesis.....	6
3.2.1 Obstrucción de las vías aéreas de pequeño calibre.....	7
3.2.2 Destrucción alveolar.....	8
3.3 Inflamación en EPOC.....	8
3.3.1 Inflamación pulmonar.....	8
3.4 Deficiencia de AAT.....	11
3.4.1 Herencia y Polimorfismo del gen SERPINA1.....	12
3.4.2 Subtipos PiM.....	13
3.4.3 Otros inhibidores de proteasas.....	14
3.5 Mecanismos moleculares.....	15
3.5.1 Respuesta de fase aguda.....	17
3.5.1.1 Proteína C reactiva.....	17
3.5.1.2 Interleucina 6 (IL6).....	18
3.5.1.3 Factor de necrosis tumoral (TNF).....	18
3.5.1.4 Interleucina 1 β (IL1 β).....	18
3.6 Sistema HLA.....	19
3.6.1 Antecedentes históricos del HLA.....	19
3.6.2 Nomenclatura.....	21
3.6.3 Asociación HLA con enfermedad.....	23
3.7 Mecanismos de daño al DNA en EPOC.....	25
3.7.1 BIK.....	26
3.7.2 STK39.....	27
4.0 Antecedentes	28
5.0 Hipótesis	34
6.0 Objetivo General	35
6.1 Objetivos Particulares	35
7.0 Participantes	36
7.1 Selección de participantes.....	36
7.1.1. Definición de caso y control.....	36
7.1.2 Criterios de inclusión, no inclusión y eliminación.....	37
8.0 Metodología	39
8.1 Obtención de DNA genómico.....	39
8.2 Tipificación molecular de los alelos HLA clase II.....	39
8.3 Discriminación alélica para genotipificación de SNPs.....	41
8.4 inmunodetección de p53.....	42
8.5 Análisis Estadístico.....	43
9.0 Resultados	44
9.1 Participantes en el estudio.....	44
9.2 Discriminación alélica de variantes tipo SNP.....	44
9.3 Genotipificación de HLA.....	48
9.4 Inmunodetección de p53.....	54
10.0 Discusión	56
11.0 Conclusión	61
12.0 Referencias Bibliográficas	62
13.0 Anexos	76

I. Abreviaturas empleadas

53BP1	Proteína 1 de unión a p53.
AP1	Factor de transcripción AP.
AAT	α 1-antitripsina.
ACT	α 1-antiquimiotripsina.
BIK	Proteína citocida-interactuante con <i>BCL-2</i> .
CCR3	Receptor 3 de quimiocinas CC.
CRP	Proteína C reactiva.
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo.
CXCL1	Ligando 1 de citocinas CXC.
CXCL1-3	Proteína relacionada a crecimiento α , β y γ .
CXCL5	Ligando 5 de citocinas CXC.
CXCL6	Ligando 6 de citocinas CXC.
CXCL7	Ligando 7 de citocinas CXC.
CXCL8 (IL8)	Ligando 8 de citocinas CXC.
DDR	Respuesta de daño al DNA.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados.
ENA78	Atrayente de neutrófilos derivado de células epiteliales-78.
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.
FEV1	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo.
FEV1/FVC	Relación FEV1/FVC.
FVC	Capacidad vital forzada.
G3PDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa.
G-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas.
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos.
HLA	Antígenos leucocitarios humanos.
IC	Intervalo de confianza del 95%.
IEF	Isoelectroenfoque.
IFN γ	Interferón- γ .
IL17	Interleucina 17.
IL17A	Interleucina 17A.
IL17F	Interleucina 17F.
IL1RA	Receptor antagonista de IL1.
IL1 β	Interleucina 1 β .
IL22	Interleucina 22.
IL3	Interleucina 3.
IL6	Interleucina 6.
JNK	Cinasa p44/42.
LEBC	Células de barrera del epitelio pulmonar.
MAPK	Protein-cinasas activadas por mitógenos.
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad.
NAC	N-Acetil Cisteína.
NTC	Controles sin templado (del inglés <i>No-Template Controls</i>).

OR	Razón de momios (del inglés <i>Odds ratio</i>).
PBD	Panbronquiolitis difusa.
pC	Valor de p con corrección de Yates
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PCR-SSP	PCR iniciadores secuencia específica.
Pi	Inhibidor de proteasas.
RE	Retículo endoplásmico.
RHBD1	Serin-proteasa de la familia romboide.
RNA	Ácido ribonucleico.
ROS	Especies reactivas del oxígeno.
SLPI	Proteinasa inhibidora-secretora de leucocitos.
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido.
STK39	Cinasa de serin-treonina.
sTNF-R75	Receptor soluble 75 de transmembrana para TNF.
TGF- β	Factor de crecimiento transformante- β .
TNF	Factor de necrosis tumoral.
α 2MG	α 2-macroglobulina.

II. Siglas empleadas

ALAT	Asociación Latinoamericana de Tórax.
ASHI	Sociedad Americana de Histocompatibilidad e Inmunogenética.
GOLD	Iniciativa Global para Enfermedades Pulmonares Obstructivas (por sus siglas en inglés <i>Global Initiative for Obstructive Lung Disease</i>).
PLATINO	Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción Pulmonar.

1.0 Resumen

Introducción: La enfermedad pulmonar obstructiva crónica es una enfermedad caracterizada por la limitación de flujo aéreo que no es completamente reversible. Aunque fumar cigarro es el principal factor de riesgo ambiental para desarrollar EPOC, solo del 10-20% del total de los fumadores desarrollan la enfermedad, lo cual sugiere que existen otros factores que influyen en el desarrollo de la misma; otro factor de riesgo ambiental es la exposición al humo de leña. Aunque principalmente afecta a los pulmones, el proceso inflamatorio de la EPOC tiene repercusiones sistémicas. Se han encontrado niveles elevados de marcadores inflamatorios en circulación de pacientes con EPOC, como proteína C reactiva (CRP), la proteína de unión a lipopolisacárido, el receptor soluble 75 de membrana para TNF (sTNF-R75), y moléculas de adhesión solubles. Por otro lado, se ha descrito la contribución de la variación alélica del sistema de HLA (*Human Leukocyte Antigen* por sus siglas en inglés) a un gran número de enfermedades, principalmente de tipo autoinmune e inflamatorio, sin embargo, el papel de los alelos HLA en EPOC no ha sido investigado a detalle, a pesar de existir asociaciones de polimorfismos en genes HLA en otras enfermedades respiratorias de tipo inflamatorio como fibrosis pulmonar, neumonitis por hipersensibilidad y asma ocupacional; dentro de la fisiopatogénesis de la EPOC, el daño al DNA es ocasionado por el estrés oxidativo en respuesta a tal daño, las células inician un programa de eventos que culmina con la respuesta al daño al DNA, al mismo tiempo, se induce un programa global de transcripción que conduce a la expresión de genes como *TP53*, *STK39* y *RHBD1*, productos proteicos que arrestan el ciclo celular para facilitar la reparación del DNA. **Objetivo:** Identificar polimorfismos en genes involucrados en la inflamación y daño al DNA asociados con EPOC. **Material y métodos:** Los individuos fueron seleccionados de agosto del 2009 a julio del 2010, captados de las clínicas de EPOC y de ayuda para dejar de fumar, pabellón de enfermedades obstructivas y consulta externa, todos del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. Se incluyeron individuos con hábito tabáquico mayor a 10 cigarros/día, por más de 10 años, mestizos mexicanos por abolengo y con pruebas de función pulmonar indicativa de EPOC, para el grupo de casos y función pulmonar normal para el grupo control. El DNA se obtuvo a partir de sangre periférica y fue extraída con un estuche comercial; los alelos HLA-DRB1 y DQB1 fueron identificados por PCR-SSP, la discriminación alélica fue realizada con PCR en tiempo real, y la inmunodetección de p53 por *western blot*, se genotificaron 8 SNPs en 7 genes involucrados en la respuesta inflamatoria: rs16944 (*IL1B*), rs4073 (*IL8*), rs361525 y rs1800629 (*TNF*), rs25882 (*CFS2*), rs2282691 (*CCL1*), rs1800947 (*CRP*) y rs1818879 (*IL6*) y 2 SNPs involucrados en la respuesta al daño al DNA y apoptosis: rs3820928 (*RHBDD1*) y rs935381 (*STK39*), **Resultados:** De los 8 SNPs analizados involucrados en la respuesta inflamatoria, los

rs1800629 (*TNF*), rs1818879 (*IL6*) y rs4073 (*IL8*) tuvieron una asociación estadísticamente significativa: Se encontró una frecuencia genotípica del rs1800629 para el genotipo GA de 13% en casos y 5% en controles ($pC=0.0127$, $OR=3.02$, $IC\ 95\%=1.24-8.07$), para el rs1818879 se encontró una FG del 40% en controles contra 27% de casos ($pC=0.0141$, $OR=1.83$, $IC\ 95\%=1.12-3.00$) mientras que el rs4073 en *IL8* mostró una asociación positiva para el alelo A con 72% en casos contra 63% en controles ($pC=0.0124$, $OR=1.54$, $IC\ 95\%=1.09-2.17$). Para el caso de HLA se lograron determinar 13 alelos DRB1 y 15 DQB1, los alelos DRB1*04, 08, y 14 se encontraron en una frecuencia elevada en ambos grupos de estudio (30%, 15% y 12% respectivamente) lo cual es consistente con reportes previos que indican a dichos alelos como predominantes en población mexicana; por otro lado en DQB1, el alelo 06:03 mostró una diferencia estadísticamente significativa (3.63% vs 7.58%, $pC=0.042$, $OR=0.46$, $IC\ 95\%=0.21-0.97$), resultados que sugieren un efecto de protección. Posteriormente se realizó una estratificación por estadios GOLD para los pacientes, resultando asociado DRB*11 con el estadio GOLD II (12.5% vs 6.06%, $pC=0.017$, $OR=2.28$, $IC\ 95\%=1.13-4.57$) y DRB*07 (17.14% vs 6.36% $p=0.0061$, $OR=3.04$, $IC\ 95\%=1.29-6.88$) con el estadio GOLD III. **Conclusión:** Nuestros hallazgos sugieren la existencia de factores genéticos tipo SNP en *TNF*, *IL6* e *IL8* además de alelos de HLA clase II DRB1*11 y DRB1*07 que se encuentran en frecuencias incrementadas en los estadios GOLD II y III respectivamente.

2.0 Abstract

Introduction: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by airflow limitation that is not fully reversible. Although cigarette smoking is the major environmental risk factor for developing COPD, only 10-20% of all smokers develop the disease, suggesting that other factors may influence its development. The main risk factors contributing to this disease are cigarette smoke and exposure to biomass smoke. Although this risk factor primarily affects the lungs, the inflammatory process of COPD has systemic implications. There have been found elevated levels of circulating inflammatory markers in patients with COPD, such as C-reactive protein (CRP), lipopolysaccharide binding protein, soluble receptor for TNF 75 transmembrane (sTNF-R75) and soluble adhesion molecules. Additionally, it has been described the contribution of the HLA system allelic variation (Human Leukocyte Antigen) to several diseases, mainly autoimmune and inflammatory, but the role of HLA alleles in COPD has not been investigated in detail, although there are associations of polymorphisms in HLA genes in other inflammatory respiratory diseases such as pulmonary fibrosis, hypersensitivity, pneumonitis and occupational asthma. On the other hand, within the COPD physiopathogenesis, DNA damage is caused by oxidative stress, as response to such damage, cells initiate a program of events culminating with the DNA damage response, while it induces Global transcriptional program that leads to the expression of genes such as p53, STK39 and RHB1, which arrest the cell cycle to facilitate repair of DNA. **Objective:** To identify polymorphisms in genes involved in inflammation and DNA damage associated with COPD. **Methods:** Subjects were selected from August 2009 to July 2010, captured from the COPD and Smoking Cessation Clinics, all from the *Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas*. We included individuals with more than 10 cigarettes per day for over 10 years smoking history, with Mexican mestizo ancestry, and pulmonary function tests indicating COPD for the case group and normal lung function for the control group. DNA was obtained from peripheral blood, extracted with a commercial kit. HLA-DRB1 and DQB1 were identified by PCR-SSP, allelic discrimination was performed with real-

time PCR, and p53 immunodetection by western blot. 8 SNPs were genotyped in 7 inflammatory response genes: rs16944 (*IL1B*), rs4073 (*IL8*), rs361525 and rs1800629 (*TNF*), rs25882 (*CFS2*), rs2282691 (*CCL1*), rs1800947 (*CRP*) and rs1818879 (*IL6*); and 2 SNPs involved in the response to DNA damage and apoptosis: rs3820928 (*RHBDD1*) and rs935381 (*STK39*).

Results: Three of the 8 inflammatory response SNPs analyzed showed positive association: rs1800629 (*TNF*), rs1818879 (*IL6*) and rs4073 (*IL8*): The GA genotype for the rs1800629 had a frequency of 13% in cases vs 5% in controls (pC = 0.0127, OR = 3.02, 95% CI = 1.24-8.07), the rs1818879 frequency was 40% in controls vs 27% of cases (pC = 0.0141, OR = 1.83, 95% CI = 1.12-3.00) and rs4073 in the *IL8* gene, showed a positive association for the A allele with 72% in cases against 63% in controls (p = 0.0124, OR = 1.54, 95% CI = 1.09-2.17). Additionally, we were able to determine 13 HLA alleles for DRB1 and 15 for DQB1; besides DRB1*04, 08, and 14 alleles were found in high frequency for both study groups (30%, 15% and 12% respectively) which is consistent with previous reports that indicate such alleles as dominant in the Mexican population. By the other hand, DQB1 06:03 allele showed a statistically significant difference (3.63% vs 7.58%, pC = 0.042, OR = 0.46 CI 95% = 0.21-0.97), suggesting a protective effect. Subsequently, we performed a GOLD stages patients stratification, showing association DRB*11 allele with GOLD stage II (12.5% vs 6.06%, pC = 0.017, OR = 2.28, 95% CI 1.13-4.57) and DRB*07 (17.14% vs 6.36% pC = 0.0061, OR = 3.04, 95% CI 1.29-6.88) with GOLD stage III.

Conclusion: Our findings suggest the existence of genetic factors SNP type in *TNF*, *IL6* and *IL8*, in addition to HLA class II alleles DRB1*11 and DRB1*07 found in GOLD stage II and III respectively increased frequency.

3.0 Introducción

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se caracteriza por la limitación del flujo aéreo con desarrollo progresivo, lento e irreversible. Recientemente la *Global Initiative for Obstructive Lung Disease* (GOLD, por sus siglas en inglés) ha adoptado una nueva definición de EPOC: “Un estado de enfermedad caracterizado por la limitación de flujo aéreo que no es completamente reversible. La limitación de flujo respiratorio es anormalmente progresiva y se asocia con la respuesta anormal e inflamatoria de los pulmones a partículas y gases nocivos” (1).

3.1 Epidemiología

Aunque fumar cigarro es el principal factor de riesgo ambiental para desarrollar EPOC, solo entre el 10-20% del total de los fumadores desarrolla la enfermedad, lo cual sugiere que existen otros factores que influyen en el desarrollo de la misma. Algunos estudios calculan que fumar contribuye con el 15% en el deterioro de la función pulmonar, mientras que factores genéticos lo hacen hasta en un 40% (2). Los principales factores extrínsecos contribuyentes en la etiología son las fuentes exógenas directas de oxidantes, como el humo de cigarro (3) y en países emergentes como Nepal, Colombia y México también se relaciona con la exposición al humo de leña (4).

La prevalencia real de la EPOC es incierta, datos recientes en países europeos han sugerido que entre 4-6% de la población adulta padece EPOC, por otro lado, la EPOC es una de las principales causas de discapacidad crónica y se prevé que para el año 2020 será la quinta causa más frecuente de discapacidad en el mundo. La prevalencia mundial de la EPOC oscila entre el 5-10%, además ha aumentado en las últimas décadas y es más frecuente en hombres que en mujeres, para el caso de la exposición

al humo de cigarro. El proyecto PLATINO (Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción Pulmonar), llevado a cabo por la ALAT (Asociación Latinoamericana de Tórax), permitió conocer la prevalencia de la EPOC en cinco países de Latinoamérica, encontrando que los porcentajes de un país a otro varían desde un 7.8% en la Ciudad de México a un 17% en Montevideo. De acuerdo con una encuesta realizada en México D.F., la prevalencia de fumadores en individuos mayores de 12 años es 43/100 hombres y de 21/100 mujeres; la prevalencia de exfumadores es de 30/100 hombres y de 21/100 mujeres, lo que muestra el riesgo potencial que existe en México para el desarrollo de EPOC y otras enfermedades relacionadas con la exposición a humos contaminantes en nuestro medio. Además, la EPOC en México podría tener una prevalencia mayor, al igual que en otros países en vías de desarrollo, por el uso del carbón vegetal y leña como materiales de combustión domésticos, lo que es considerado en la actualidad un factor importante de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad. Debemos tomar en cuenta que en la ciudad de México, las manifestaciones de esta enfermedad son las más severas, debido a la disminución de la presión de oxígeno en la atmósfera como consecuencia de la altitud (5).

3.2. Patogénesis

La EPOC se caracteriza por un desarrollo lento y progresivo de la limitación del flujo de aire que es poco reversible, en contraste con el asma, donde la obstrucción es variable y usualmente es reversible espontáneamente o con tratamiento (6). Dentro de los principales factores extrínsecos contribuyentes a la etiología están las fuentes exógenas directas de oxidantes, como el humo de cigarro y la exposición al humo procedente de la quema de biomasa. En tanto que las aportaciones endógenas de

radicales libres provienen de células epiteliales e inflamatorias, principalmente neutrófilos y macrófagos que migran a la vía aérea (7). La EPOC incluye bronquiolitis con fibrosis, obstrucción de vías aéreas pequeñas, enfisema con alargamiento de los espacios aéreos, destrucción del parénquima pulmonar, pérdida de elasticidad pulmonar y cierre de las vías aéreas pequeñas. La bronquitis crónica es definida por producir tos de más de tres meses de duración, por más de dos años sucesivos, esto es reflejo de la hipersecreción de moco y no necesariamente se asocia con la limitación del flujo de aire (8).

3.2.1 Obstrucción de las vías aéreas de pequeño calibre

La obstrucción de las vías pequeñas en pacientes con EPOC está ampliamente documentada (9), con aumento en el grosor de las vías aéreas pequeñas, incremento de la formación de folículos linfoides y deposición de colágena en la pared exterior de las vías aéreas que puede restringir la apertura de estas vías (10). El lumen de las vías pequeñas es reducido por un engrosamiento de la mucosa que contiene un exudado inflamatorio, el cual incrementa con la gravedad de la enfermedad. El mecanismo de la formación del folículo linfoide es aún desconocido, pero puede ser una respuesta a la colonización bacteriana crónica y exacerbaciones agudas en la inflamación. Los mecanismos de fibrosis en las vías aéreas aún no se han entendido del todo, pero probablemente se deben a un proceso de reparación de inflamación crónica. El papel de factores de crecimiento específicos como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), cuya expresión se ha visto aumentada en vías aéreas de pequeño calibre (11), puede inducir fibrosis vía liberación del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) el cual puede estimular la deposición de colágena en las vías aéreas (12).

3.2.2 Destrucción alveolar

Los alvéolos están compuestos de una red virtual entre neumocitos tipo I y II, células endoteliales y fibroblastos. Esta red estructural única ofrece un mecanismo potencial para entender la disfunción de las células de la pared alveolar como resultado de la exposición al humo de cigarro. La destrucción alveolar ocurre debido a que los neumocitos tipo I y II, células endoteliales y miofibroblastos son dañados consecutivamente. El enfisema consiste en una respuesta de daño de las células alveolares en la cual los elementos estructurales desaparecen provocando una disminución en el área de intercambio capilar (13).

3.3 Inflamación en EPOC

La EPOC se reconoce como una enfermedad sistémica con importantes manifestaciones extrapulmonares que tienen repercusiones en diferentes órganos. Se asocia con diversas complicaciones de la respuesta inflamatoria sistémica, como pérdida de peso, disfunción del músculo esquelético, osteoporosis, progresión a aterosclerosis, enfermedad arterio-coronaria, ansiedad, depresión, y alta prevalencia de cáncer de pulmón (14). Los mecanismos de la inflamación sistémica son de gran interés por que representan en gran parte la mortalidad y morbilidad de los pacientes con EPOC (15).

3.3.1 Inflamación pulmonar

La EPOC es una condición caracterizada por inflamación de la vía aérea y remodelación, inflamación del parénquima pulmonar y destrucción; resultando en

obstrucción del flujo espiratorio de aire, hiperinflación pulmonar con pérdida de la reactividad elástica y finalmente intercambio gaseoso alterado (10). El daño tisular con remodelación y engrosamiento de la pared, inflamación y fibrosis de las vías aéreas pequeñas parecen jugar un papel importante en la patogénesis de la EPOC (10). La inflamación del parénquima pulmonar, el estrés oxidativo, apoptosis y eventual proteólisis resulta en destrucción enfisematosa de la pared alveolar (16).

Existen dos hipótesis que tratan de explicar esta respuesta anormal: 1) desequilibrio en el sistema oxidantes/anti-oxidantes y 2) desequilibrio en el sistema proteasas/anti-proteasas (17).

1) Sistema oxidantes/antioxidantes

La principal consecuencia del estrés oxidativo es la peroxidación de lípidos, la cual es ocasionada por una reacción en cadena de radicales libres que afecta a ácidos grasos poliinsaturados de membrana; si esta reacción no cesa, puede ocasionar daño permanente en membranas, causando muerte celular. La exposición a oxidantes contenidos en el aire puede causar peroxidación en humanos y roedores (18, 19). Además, el incremento en el número de células inflamatorias y macrófagos alveolares puede contribuir al aumento de un ambiente pro-oxidante en el tejido pulmonar de pacientes con EPOC (20). La activación de señalizaciones intracelulares es otra vía por la cual el estrés oxidativo puede causar una respuesta patológica en el pulmón. Los contaminantes del aire y la especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) activan la señalización MAPK (proteín-quinas activadas por mitógenos) lo cual promoverá inflamación. Un ejemplo de esto es la inhibición de la quina c-Jun amino-terminal en ratón, atenuada con ozono que induce inflamación e hiperreactividad (21). Además, los productos finales de la peroxidación de lípidos activan señales

extracelulares reguladas por las cinasas p44/42, JNK y p38 MAPK y la activación puede ser bloqueada por NAC (N-acetil-cisteína) (19, 22). La activación de estas cinasas puede también ser acompañada por el incremento de la actividad del factor de transcripción AP-1, la cual puede conducir a la transcripción de genes de respuesta al estrés incluyendo enzimas de fase II. (22).

2) Sistema de proteasas/antiproteasas

Esta hipótesis fue formulada hace casi 40 años en respuesta a dos observaciones principales: En primer lugar, la deficiencia genética de α_1 -antitripsina (AAT) la cual es el principal inhibidor de la elastasa de neutrófilos en el tracto respiratorio bajo y que está asociada con el inicio temprano de enfisema panlobular severo (23); en segundo lugar, la instilación de papaína (una enzima con actividad de elastasa) en pulmón de rata resulta en alargamiento progresivo del espacio aéreo (24). Estas dos observaciones llevaron a la hipótesis de que la inhalación de humo de cigarro (u otros gases nocivos) conduce al reclutamiento de células inflamatorias en los pulmones. Las células inflamatorias liberan varias proteasas que exceden la protección de inhibición de las antiproteasas en los pulmones. Las proteasas degradan sin control las proteínas de la matriz extracelular, componentes de la pared alveolar (especialmente las fibras elásticas) produciendo destrucción y pérdida de la pared alveolar y engrosamiento de la vía aérea (25).

Las proteasas son enzimas que rompen los puentes peptídicos internos de polipéptidos (26, 27). Estas pueden ser clasificadas en 4 grupos de acuerdo a su naturaleza química o por el sitio activo en: serin-, metalo-, cisteín- y asparto proteasas.

Se piensa que el enfisema inducido por fumar puede ser mediado en parte por la inhibición directa y prolongada de las antiproteasas en el tejido pulmonar (28-30). Una

clara consecuencia es que las proteasas, por ejemplo la elastasa de neutrófilos, puedan causar daño en el tejido bajo estas condiciones. Los neutrófilos, como parte del sistema inmunológico innato, son parte integral de la vigilancia en las superficies de las mucosas (31). Las proteasas, incluida la elastasa de neutrófilos juegan un papel importante en las reacciones contra la invasión de microorganismos.

3.4 Deficiencia de AAT

La primera descripción de la deficiencia de AAT fue descrita por Laurell y Eriksson en 1963, después de una revisión de las proteínas séricas por electroforesis, se observó la ausencia de la banda de la proteína α -1 en 5 de casi 1500 geles (23). Eriksson demostró que los 5 pacientes tenían enfisema con edades de 35, 38 y 44 años, además de historia familiar de enfisema (24).

La deficiencia de AAT es heredada como un desorden autosómico codominante; la AAT está codificada por el gen SERPINA1, localizado en el brazo corto del cromosoma 14 (banda citogenética 14q31-32.3); tiene una extensión de 12.2 kb y está organizado en cuatro exones codificantes (23, 32, 33) y tres exones no codificantes (1a, 1b y 1c). Los fenotipos son clasificados por un sistema de códigos, en el cual los alelos heredados son usualmente letras que denotan la migración de la molécula en un gradiente isoeléctrico de A (anódicas) a Z (variantes de baja migración). El fenotipo MM indica individuos que son homocigotos para el alelo normal M y ZZ se asigna a los individuos que son homocigotos para el alelo Z, mutaciones que son la causa de la deficiencia severa de AAT.

3.4.1 Herencia y polimorfismo del gen SERPINA1

El gen de SERPINA1 se transmite por herencia mendeliana simple de manera autosómica codominante mediante 2 alelos, uno de cada progenitor, que se expresan independientemente en los hijos al 50% (34, 35).

Este gen se caracteriza por su gran polimorfismo. Mediante isoelectroenfoque (IEF) se han identificado hasta la fecha más de 70 variantes proteicas (34), y con el avance de las técnicas de identificación, el número alcanza las 100 (36). El conjunto de variantes es denominado sistema Pi (del inglés *protease inhibitor*). La mayoría de las variantes carecen de significado clínico, solo alrededor de 30 se sabe que pueden tener repercusiones patológicas (34).

Las variantes se clasifican de acuerdo con su velocidad de migración electroforética en un campo magnético con distintos gradientes de pH. Los investigadores pioneros en el tema denominaron M (del inglés "*medium*") a las de velocidad media, F (del inglés "*fast*") a las de velocidad rápida, y S (del inglés "*slow*") a las de migración lenta (37).

Cuando se descubrieron nuevas variantes, se designó con las letras iniciales del alfabeto a las anódicas y con las finales a las catódicas (34). El genotipo "normal", presente en más del 90% de los sujetos sanos (94-96% en población caucásica), se denomina PiMM y se caracteriza por niveles séricos de la proteína entre 150-350 mg/100 ml (20-48 μ M). Las variantes S (Glu264Val) y Z (Glu342Lys) constituyen el 95% de las mutaciones en pacientes con deficiencia severa de AAT. Ambas son mutaciones sin sentido en el gen SERPINA1. Individuos con genotipos SS, SZ y ZZ expresan concentraciones séricas de la proteína de 85%, 25% y 15% respectivamente, con respecto a los niveles normales (genotipo MM) (36). El homocigoto para la variante S no ha sido asociado con enfermedad y son pocos los estudios enfocados a determinar el riesgo a desarrollar enfisema entre los genotipos SZ (38), la mayoría de los estudios

concluyen que el genotipo SZ es menos importante que ZZ, debido a que los pacientes con genotipo SZ desarrollan enfisema a una edad mayor que aquellos portadores del ZZ (34). Sin embargo, no queda claro si las diferencias en el riesgo son relacionadas a la dispersión en los niveles séricos de AAT entre las poblaciones en estudio u otros factores desconocidos al momento.

3.4.2 Subtipos PiM

PiMM es el genotipo común (“normal”) del gen SERPINA1, las diferentes variantes alélicas de éste gen (PiZ, PiS, PiP, PiL, PiW y Pi nulos), frecuentemente conducen a deterioro en la actividad de AAT. Los alelos PiZ y nulos han sido ampliamente reportados como factores predisponentes al desarrollo de EPOC, debido a la carencia de antiproteasas en los fluidos biológicos, particularmente en el intersticio pulmonar. Generalmente se considera que los subtipos de PiM (PiM1, PiM2, PiM3 y PiM4, etc.) expresan niveles normales de SERPINA1 en el suero (39). Estas mutaciones han sido consideradas como normales, sin efectos en las habilidades funcionales de la proteína, sin embargo, algunos de estos alelos se han asociado con la patogénesis de ciertas enfermedades, tal es el caso de PiM1 cuya asociación se ha encontrado en sudafricanos asmáticos de raza negra (40). Respecto a EPOC, Gupta y colaboradores realizaron un estudio en población de la India, encontrando una frecuencia aumentada del alelo PiM3 (Glu376Asp) en sujetos con EPOC, pero estos datos que deben ser tomados con cautela, puesto que el tamaño de la muestra empleada no es ideal (41).

3.4.3 Otros inhibidores de proteasas

Otros inhibidores de serin proteasas tales como alfa1 antiqumiotripsina (ACT), alfa2 macroglobulina (α 2MG), antitrombina y antiplasmina son importantes en el control de la actividad de serinproteasas; éstos últimos son producidos por el hígado y alcanzan los tejidos blanco por difusión pasiva (42), otros, como la antileucoproteinasa (codificada por el gen SLPI, por sus siglas en inglés: *Secretory Leukocyte Proteinase Inhibidor*) y elafin/SKALP, son producidos localmente por células epiteliales de la vía aérea (43). Diferentes estudios han propuesto que SLPI es importante para la protección del epitelio respiratorio al ser el principal inhibidor anti elastasa del bronquio; en contraste con la actividad de AAT, SLPI bloquea la unión elastina-elastasa en la pared alveolar, lo cual puede proteger contra el desarrollo de EPOC, debido a éste hecho, se ha sugerido que existe cierto mecanismo de “compensación” por parte de inhibidores de proteasas diferentes a SERPINA1, en los casos de deficiencia de ésta última. A este respecto, Hollander y colaboradores determinaron los niveles plasmáticos de AAT, ACT y SLPI en individuos sanos y pacientes con EPOC, en ambos casos incluyendo sujetos con y sin deficiencia de AAT (genotipos ZZ, SZ y MM), no encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de ACT o SLPI entre individuos sanos, mientras que los pacientes con EPOC tuvieron niveles plasmáticos elevados de ACT y SLPI en relación con los controles, sin embargo, estiman que los niveles plasmáticos de ACT y SLPI no se encuentran elevados en sujetos con deficiencia de AAT y no parece existir un sistema de compensación para la deficiencia de AAT, que sea atribuible a ACT y/o SLPI (44).

3.5 Mecanismos moleculares

Las células presentadoras de antígeno, como las células dendríticas, pueden ser activadas por señales de daño/alarma producidas por células dañadas, después de la exposición a patógenos, toxinas, daño mecánico y/o humo de cigarro. Se han descubierto señales de alarma endógenas como DNA y RNA alterado, proteínas de choque térmico, interferón- γ (IFN γ), interleucina-1b (IL1b), CD40-L y productos de rompimiento hialurónico (45, 46). Después de esto, las células dendríticas viajan a los nódulos linfáticos con señales de alarma, producidas por las células de barrera del epitelio pulmonar (LEBC), presentan antígenos a los linfocitos T vírgenes, induciendo proliferación de linfocitos T CD8+ citotóxicos (1, 47). Las células CD8+ migran a los sitios del daño inicial y atacan las LEBC con la liberación de perforinas y granzimas; las perforinas forman poros en las membranas de las células blanco, mientras que las granzimas y serinproteasas entran al citoplasma de las células, alterando su función y/o activando la muerte celular, este mecanismo se esquematiza en la figura 1 (48, 49).

Otras estirpes celulares que se han relacionado con enfermedades pulmonares crónicas son los linfocitos T CD4 cooperadores (CD4+) y las células T_H17, que han sido asociadas al desarrollo de una respuesta protectora en los pulmones. En ratón se ha demostrado que la IL17 le confiere protección contra infecciones pulmonares, provocadas por *Klebsiella pneumoniae* (50). Varios reportes han descrito la capacidad de IL17A, IL17F e IL22 para inducir la secreción de CXCL8 (IL8), CXCL1, CXCL5, IL6, G-CSF, y GM-CSF por células epiteliales de la vía aérea (51, 52). Todos estos factores contribuyen a la multiplicación de neutrófilos de la médula ósea así como su supervivencia y reclutamiento en las vías respiratorias, destacando la importancia de las citocinas efectoras secretadas por T_H17 en la regulación de la inflamación e inmunidad de los pulmones (53).

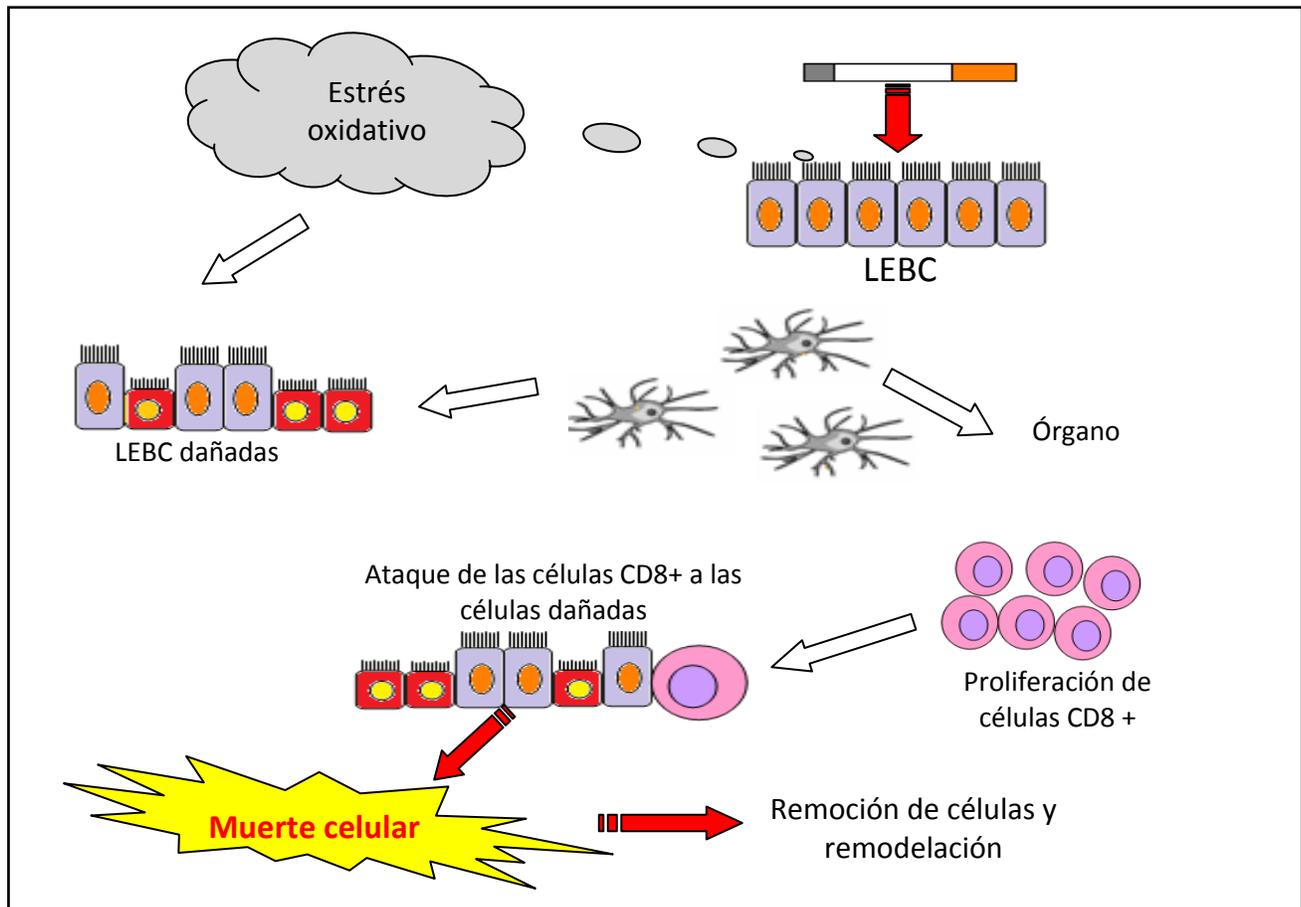


Figura 1.- El estrés oxidativo produce daño al DNA, en células de barrera del epitelio pulmonar (LEBC), las células dendríticas reconocen este daño y son activadas para viajar a nodos linfáticos, en los nodos linfáticos existe proliferación de células CD8+, las células CD8+ viajan al lugar de daño inicial, liberando granzimas y perforinas para atacar a las células dañadas, esto produce la activación de muerte celular, las células muertas son removidas provocando un remodelación aberrante.

En EPOC estable es característica la infiltración celular de la mucosa bronquial con incremento en el número de linfocitos T CD8+ y macrófagos (54-57), pero no de neutrófilos (54). Sin embargo, en exacerbaciones en EPOC leve hay un incremento del número de neutrófilos y sus marcadores (55, 58, 59); además de que existe acumulación de eosinófilos en la mucosa bronquial (55), probablemente debido a la regulación positiva de quimioatrayentes de eosinófilos, posterior a la activación, expresadas en células T, cuyos efectos pueden ser mediados a través del receptor de

quimiocinas 3 (CCR3) (60). La quimioatracción de neutrófilos puede ser realizada vía citocinas selectivas de neutrófilos como la proteína relacionada a crecimiento α , β y γ (CXCL1-3), atrayente de neutrófilos derivado de células epiteliales-78 (CXCL5, también conocido como ENA-78), proteína humana quimiotáctica de granulocitos 2 (CXCL6), péptido-2 activador de neutrófilos (CXCL7) y CXCL8 (26,61, 62).

3.5.1 Respuesta de fase aguda

La respuesta de fase aguda es una etapa temprana y clave del componente sistémico de la respuesta inmune innata. Aunque principalmente afecta a los pulmones, el proceso inflamatorio de la EPOC tiene repercusiones sistémicas. Se han encontrado niveles elevados de marcadores inflamatorios en circulación de pacientes con EPOC, como proteína C reactiva (CRP), la proteína de unión a lipopolisacárido, el receptor soluble 75 de transmembrana para TNF (sTNF-R75), y moléculas de adhesión solubles (8, 49, 63).

A continuación se describen algunas citocinas y proteínas involucradas en inflamación que han sido asociadas con EPOC:

3.5.1.1 Proteína C reactiva

La PCR, es un marcador de inflamación al cual se han asociado los niveles aumentados con riesgo de infarto al miocardio, angina inestable y muerte coronaria súbita. Esta proteína contribuye al reclutamiento de leucocitos circulantes, a la captación de lipoproteínas de baja densidad por macrófagos, y finalmente a la desestabilización de la pared vascular por la formación de ateroma (64).

3.5.1.2 Interleucina 6 (IL6)

Es una citocina pleiotrópica que juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmunológica e inflamatoria. Es producida por células T, monocitos, fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos. Estimula la diferenciación de células B y producción de anticuerpos, hace sinergia con IL3 en el desarrollo de megacariocitos y producción de plaquetas, induce la expresión de proteínas hepáticas de fase aguda, y se ha visto asociada con deterioro de la capacidad funcional, actividad física diaria reducida y deterioro general del estado de salud (65-67).

3.5.1.3 Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)

Es el principal mediador de la respuesta inmunológica frente a las bacterias gramnegativas y también puede desempeñar un papel en las respuestas inmunitarias innatas frente a otros organismos infecciosos. La liberación de TNF- α produce activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, que conduce al reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento, provocando la activación de los linfocitos T y B. También aumenta la activación y adhesión plaquetaria (5).

3.5.1.4 Interleucina 1 β (IL1 β)

IL-1 β es miembro de la familia de interleucina 1. Esta citocina es producida por los macrófagos activados como pro-proteína, que es procesada proteolíticamente a su forma activa de caspasa 1 (CASP1/ICE) Tiene acciones similares al TNF y es un potente activador de macrófagos alveolares en pacientes con EPOC (68).

Dentro de las moléculas importantes involucradas en la respuesta inflamatoria en el contexto de la presentación de antígenos se encuentran los antígenos leucocitarios humanos, los cuales han sido asociados previamente con enfermedades respiratorias de corte inmunológico, a continuación se describe a fondo dicho sistema inmunológico.

3.6 Sistema HLA

El sistema de HLA (*Human Leukocyte Antigen* por sus siglas en inglés) es el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) en humanos. Se extiende a lo largo de aproximadamente 4,000 Kb en el brazo corto del cromosoma 6; consiste en una serie de genes que se encuentran agrupados como clase I, II y III (69). Los genes localizados en las regiones I y II codifican antígenos de superficie, mientras los genes de la región III codifican diversas proteínas solubles, incluyendo C2 y C4 de la vía clásica del complemento, el factor B de la vía alterna, la 21-hidroxilasa A y B, así como el TNF- α . El sistema HLA, es la región génica más polimórfica en humanos (70). La figura 2 esquematiza la organización de los *loci* del sistema HLA.

3.6.1 Antecedentes históricos del HLA

A principios de la década de 1930, Snell y Gorer, descubrieron un *locus* en el cromosoma 17 de ratones que era el determinante primario de la aceptación o rechazo del trasplante de tejido de una cepa a otra, lo llamaron *locus* H-2. Dausset y colaboradores definieron en la década de 1950 un *locus* similar en el humano. Investigaciones posteriores demostraron que el H-2 contenía muchos genes codificadores de antígenos de trasplante, es decir, proteínas que se expresan en la superficie celular.

Figura 2. Esquematación de la región génica de HLA.

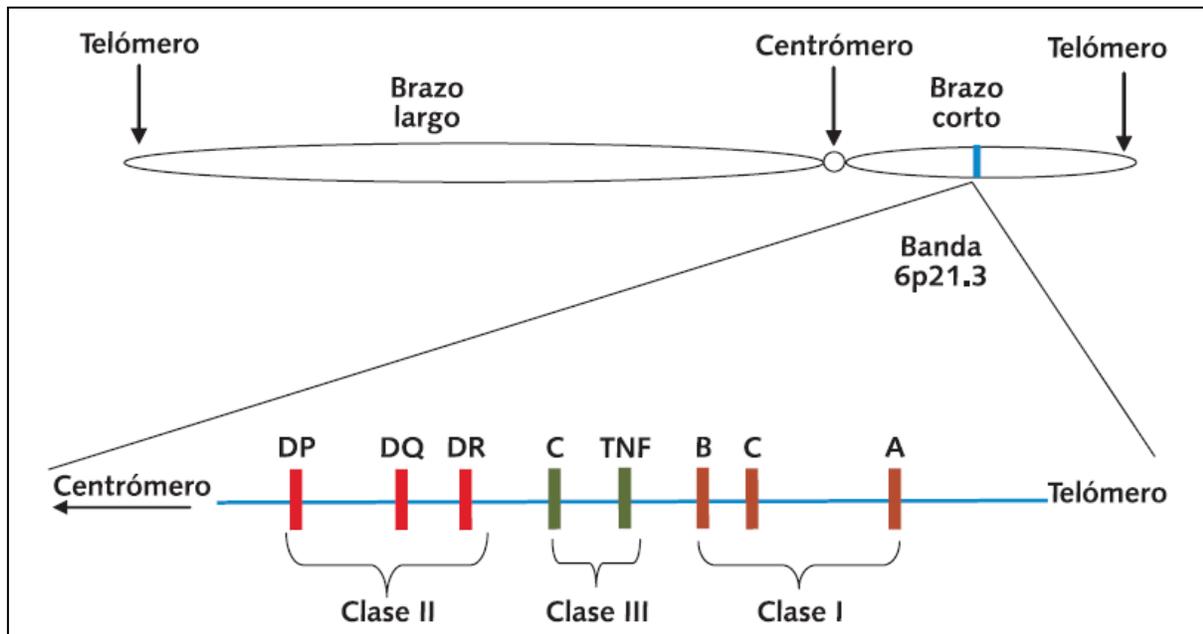


Figura 2.- Localización y organización de los *loci* del sistema HLA en el cromosoma 6. Los *loci* del sistema HLA se encuentran en el brazo corto del cromosoma 6, los genes de clase II en posición centromérica, mientras que los genes de clase I se orientan hacia el telómero, los genes de clase III están localizados entre estas dos regiones génicas.

Gorer, al tratar de diferenciar cepas endogámicas de ratones, estableció dos sistemas antigénicos, el primero fue común a todas las cepas difiriendo únicamente en cantidad, a éste le denominó "Antígeno I" (Ag I), el segundo, (Ag II) le pareció particularmente interesante ya que estaba presente en algunas cepas, pero ausente en otras y se transmitía de forma dominante de acuerdo a las leyes de segregación Mendeliana (71). Entonces se acuñó la expresión Complejo Principal de Histocompatibilidad "MHC" (del inglés *Major Histocompatibility Complex*), a las versiones humanas de estas moléculas se les conoce actualmente como Antígenos Leucocitarios Humanos o HLA por sus siglas en inglés (72).

El sistema HLA es una de las regiones más profundamente estudiadas en el genoma humano debido a la asociación de sus diferentes *loci* con autoinmunidad, infecciones, enfermedades inflamatorias y trasplantes. La primera asociación de HLA con

enfermedad fue en 1967, cuando se encontró que antígenos HLA-B tenían una frecuencia elevada en pacientes con linfoma de Hodgkin. Una de las complicaciones en la identificación de las variantes causa-enfermedad asociadas a HLA, es la gran variabilidad de este sistema, de hecho HLA-B es el gen más polimórfico del genoma humano (73).

3.6.2 Nomenclatura

Cada nombre de un alelo de HLA tiene número único de cuatro, seis u ocho dígitos. La longitud de la designación del alelo depende de la secuencia del alelo. Todos los alelos reciben por lo menos un nombre de cuatro cifras; seis y ocho dígitos se asignan solamente cuando son necesarios.

Los primeros dos dígitos describen el tipo, que corresponde a menudo al antígeno serológico, el tercero y cuarto dígitos se utilizan para enumerar los subtipos (alelos, propiamente dichos), números que son asignados en el orden en la cual se han determinado las secuencias de DNA. Los alelos cuyos números diferencian en los primeros cuatro dígitos deben diferenciar en una o más sustituciones del nucleótido que cambien la secuencia de aminoácido de la proteína codificada. Los alelos que se diferencian solamente por cambios en la secuencia de los intrones o en las regiones 5' o 3' no traducidas que flanquean los exones y los intrones son distinguidas por el uso del séptimo y octavo dígito. Además del número único del alelo hay los sufijos opcionales adicionales, que se pueden agregar a un alelo para indicar su estado de la expresión. El sufijo "L" se utiliza para indicar un alelo que se ha demostrado para tener baja expresión en la superficie de la célula en comparación a los niveles normales. El sufijo "S" se utiliza para denotar un alelo que especifica una proteína que es soluble

pero no está presente en la superficie de la célula. Una “C” añadida como sufijo indica un producto del alelo que esté presente en el citoplasma pero no en la superficie de la célula. Una “A” añadida como sufijo indica una expresión aberrante, donde hay una cierta duda si una proteína está expresada. Una letra “Q” es agregada como sufijo cuando la expresión de un alelo es “cuestionable” dado que la mutación considerada en el alelo se ha demostrado previamente a la expresión normal, en la tabla 1 se puede observar un ejemplo de nomenclatura para alelos de clase II. (74).

Tabla 1. Ejemplo de nomenclatura del sistema HLA

Nomenclatura	Alelo
HLA	Región HLA y es el prefijo del gen.
<i>HLA-DRB1</i>	Un <i>locus</i> HLA en particular.
<i>HLA-DRB1*13</i>	Grupo de alelos que codifica para el antígeno DR13 o que tiene homología con otros alelos DR13.
<i>HLA-DRB1*13:01</i>	Alelo específico de HLA.
<i>HLA-DRB1*13:01:02</i>	Alelo que difiere por una mutación sinónima de <i>HLA-DRB1*13:01</i> .
<i>HLA-DRB1*13:01:01:02</i>	Alelo que tiene una mutación fuera de la región codificante de <i>DRB1*13:01:01:01</i> .
<i>HLA-DRB1*01:33N</i>	Alelo nulo, un alelo el cual no es expresado.
<i>HLA-A*30:14L</i>	Alelo que codifica a una proteína con niveles reducidos o que tiene una expresión en la superficie celular disminuida.
<i>HLA-A*24:02:01:02L</i>	Alelo que codifica a una proteína con niveles reducidos o que tiene una expresión en la superficie celular reducida, pero la mutación es encontrada fuera de la región codificante.
<i>HLA-B*44:02:01:02S</i>	Alelo que codifica a una proteína la cual es expresada como molécula de secreción.
<i>HLA-A*32:11Q</i>	Alelo que tiene una mutación que previamente ha demostrado tener efecto significativo sobre la expresión en la superficie celular, pero esta información aún no ha sido confirmada.

Fuente: <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>

Tabla 2. Número de alelos conocidos del sistema HLA clase I y HLA Clase II.

Clase I	Locus		Alelos	Clase II	Locus		Alelos
	Clásicos	A			893	DRA	
B			1,431	DRB		814	
C			569	DQA1		35	
No clásicos	E		9	DQB1		106	
	F		21	DPA1		28	
	G		45	DPB1		136	

Número de alelos de los *loci* HLA clase I y clase II al 12/09/2009 (74).

Tabla 3.- Número de alelos de los *loci* DRB

Locus	Alelos
DRB1	722
DRB2	1
DRB3	52
DRB4	13
DRB5	19
DRB6	3
DRB7	2
DRB8	1
DRB9	1

Número de alelos de la región génica DRB al 12/09/2009 (74)

Los antígenos oficialmente aceptados, y que son útiles para fines de investigación inmunológica son 6; HLA-A, B, C, DR, DP y DQ, habiendo sido designados por el *locus* que determina la especificidad antigénica, seguido de un número, los antígenos que aún no se han reconocido oficialmente se designan con la letra „w’ (de la palabra en inglés *workshop*, o taller en español) colocada antes del número y se trata de una nominación tentativa (75). En las tablas 2 y 3 se encuentran las cifras correspondientes a los alelos HLA.

3.6.3 Asociación HLA con enfermedad

Los avances ocurridos en el conocimiento de la genética y la biología de las moléculas clase I, II y III, han estimulado la investigación en el área de la asociación de enfermedades con alelos de estos genes, especialmente por el papel que tienen en la *Identificación de un perfil genético asociado a inflamación y daño al DNA como factor de riesgo a EPOC*

regulación de la respuesta inmune. La asociación con enfermedades fue demostrada primeramente en ratones, específicamente en el sistema H-2 murino, asociado con un tipo de leucemia viral inducida, esta asociación de marcador genético con una enfermedad estimuló la búsqueda de asociaciones entre los fenotipos HLA y las enfermedades en humanos (75).

Las funciones del sistema HLA representan posibles razones para la búsqueda de asociaciones con enfermedades que involucran alteraciones inmunológicas, y aunque la naturaleza de los mecanismos de dichas asociaciones en algunos casos es sólo inferida, su estudio provee un arma potencialmente útil para el análisis del significado biológico del sistema (76, 77).

Comienzan a reconocerse cada vez con mayor frecuencia los ejemplos reales del significado del polimorfismo del sistema HLA. No hace muchos años, el grupo de Adrian Hill obtuvo datos referentes a la sensibilidad humana hacia la malaria. Se ha visto que esta varía con la expresión de ciertas moléculas HLA de clase I. Las formas que confieren mayor resistencia abundan entre los habitantes de lugares donde la malaria es endémica, de acuerdo con lo que dicta la selección natural (71).

Muchas clases de adenovirus fabrican una molécula que se une a moléculas de clase I recién sintetizadas en el RE y evitan su expresión en la superficie celular. Mientras que otros sintetizan una molécula nueva que bloquea la expresión del gen de clase I. Recientemente se describió el bloqueo de la expresión en la superficie de moléculas HLA de clase I por parte de citomegalovirus y virus del herpes simple. Pero esas excepciones no invalidan la eficacia general del procesamiento del antígeno en el control inmunológico de las infecciones (72).

Desde 1973 se reportó la asociación entre espondilitis anquilosante y el antígeno HLA-B*27. Desde entonces, más de 500 patologías han sido reportadas como posiblemente asociadas con antígenos del sistema HLA. La mayoría de las enfermedades que hasta el momento se han asociado son de origen autoinmune, involucrando, en muchos de los casos la producción de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos tisulares propios. Las enfermedades asociadas con los antígenos HLA son de carácter multifactorial e incluyen tanto los factores genéticos del individuo (susceptibilidad principalmente, aunque de hecho ya se han descrito formas de protección o resistencia ligadas a estas moléculas) como factores ambientales, actuando conjuntamente para producir una enfermedad específica.

En suma, defectos en la regulación de la expresión de moléculas HLA, pueden tener profundas consecuencias inmunopatológicas.

La regulación externa (experimental) y la patológica de las moléculas HLA, ha sugerido que su manipulación puede conducir a una activación aberrante de células T observada en ciertas enfermedades autoinmunes. Consecuentemente, la elucidación de los mecanismos bioquímicos y genéticos que controlan la regulación de la expresión génica, representa el mayor reto en la inmunología molecular e inmunopatología (77).

Se han propuesto varias hipótesis que pretenden explicar los mecanismos de asociación entre los alelos del MHC y el establecimiento de la susceptibilidad a enfermedades, los de mayor relevancia, de acuerdo a las evidencias que los sustentan son; 1) mimetismo molecular (78), 2) antígeno HLA como receptor, 3) antígeno HLA modificado, 4) interacción de moléculas HLA con ligandos no inmunológicos. 5) gen en desequilibrio con alelos HLA, 6) influencia de los genes Ir o Is (79, 80).

3.7 Mecanismos de daño al DNA en EPOC

El daño al DNA dentro de la fisiopatogénesis de la EPOC, es ocasionado por el estrés oxidativo, que a su vez es inducido por la exposición al humo de cigarro, lo que ocasiona peroxidación de lípidos y aumento de células inflamatorias. En respuesta a tal daño, las células inician un programa de eventos, que culmina con la respuesta al daño al DNA (*Damage DNA Response* DDR, por sus siglas en ingles), el cual es un paso crítico para el mantenimiento de la integridad del genoma y la prevención del envejecimiento celular y tumorigénesis. (81, 82). En los sitios locales y adyacentes de las células con daño al DNA, las proteínas DDR son reclutadas. Esto ocasiona alteraciones en la cromatina que permite la atracción adicional de otros mediadores DDR como la proteína 1 de unión a p53 (53BP1) (83). Al mismo tiempo, el daño al DNA induce un programa global de transcripción que conduce a la expresión de genes que arrestan el ciclo celular para facilitar la reparación del DNA (81). Esta respuesta conlleva a la activación de la proteína supresora de tumores p53 a través de modificaciones post-traduccionales como fosforilación y acetilación. (84). p53 es una proteína que tiene un rápido cambio intracelular y no se acumula en muchas células normales. Sin embargo, la proteína es inducible por diferentes señales de estrés (85).

3.7.1 BIK

Una proteína involucrada en el proceso de apoptosis es BIK (*BCL-2 interacting killer*), se trata de una proteína de 160 aminoácidos que contiene un dominio de transmembrana, además de un dominio BH3 (86). En 2008, Wang *et ál.* Identificaron una serin-proteasa de la familia romboide, RHBD1 que libera BIK por ruptura del dominio C-terminal de transmembrana (87). Aunque RHBD1 ha sido

predominantemente localizada en la mitocondria, se ha sugerido que puede ser traslocada al retículo endoplásmico para romper BIK asociado a retículo endoplásmico (88).

3.7.2 STK39

Este gen codifica una cinasa de serina/treonina que se piensa funciona en la vía de la respuesta de estrés celular. La cinasa se activa en respuesta al estrés hipotónico, llevando a la fosforilación de varios cotransportadores acoplados a cationes cloruro. Específicamente, la cinasa activa la vía de p38 MAP y su interacción con p38 disminuye al estrés celular, lo que sugiere que esta cinasa puede servir como intermediario en la respuesta al estrés celular (89).

4.0 Antecedentes

La inflamación es un evento que ha sido ampliamente documentado en la EPOC y se han descrito gran cantidad de moléculas relacionadas a este fenómeno fisiológico. En el 2005, Pinto-Plata y colaboradores, describieron niveles séricos de PCR elevados en pacientes con EPOC y fumadores sin evidencia de enfermedades pulmonares obstructivas en comparación a un grupo de controles, los cuales nunca habían fumado o eran fumadores en abstinencia de más de 15 años o historia de fumador de menos de 20 paquetes/año (90). Existen también datos de niveles séricos elevados de otras moléculas de inflamación sistémica como IL1 β , IL6, TNF α , y fibrinógeno en pacientes con EPOC, revelando un importante componente de la inflamación sistémica en esta enfermedad. Por otro lado, las concentraciones de IL6 se han encontrado incrementadas en esputo inducido, lavado bronquioalveolar y concentrado de aire exhalado de pacientes con EPOC, particularmente durante exacerbaciones (91-93). La IL6, también se incrementa en plasma durante las exacerbaciones (94, 95).

Por lo que respecta al TNF, en 2010, Tanni y colaboradores, realizaron un estudio que mostró niveles séricos elevados de TNF en pacientes fumadores frecuentes con EPOC y fumadores crónicos sanos en comparación con no fumadores (96). En otro estudio, Gan y colaboradores encontraron concentraciones elevadas de TNF en esputo inducido y lavado bronquioalveolar de pacientes con EPOC en comparación a su grupo control. Por otro lado, en otra investigación realizada en el 2000 por Rusznak y su grupo de trabajo, las células bronquio-epiteliales en cultivo liberaron más IL1 β que las células de sujetos sin EPOC después de la estimulación con humo de cigarro (97). Sin embargo, los niveles séricos elevados de IL1 β en EPOC no han sido reportados. El receptor antagonista de IL1 (IL1RA) es un inhibidor endógeno de los efectos de IL1 y ha sido

reportado como reducido en asma. En macrófagos alveolares de pacientes con EPOC, se ha visto una secreción reducida de IL1RA comparado con los macrófagos normales, en respuesta a infección por *Chlamydia* (98). En la tabla 4 se hace un resumen sobre los hallazgos más importantes sobre algunas proteínas relacionadas con la inflamación y su relación con la enfermedad.

Tabla 4. Principales citocinas relacionadas con EPOC o rasgos fenotípicos de la enfermedad.

Citocina	Función descrita	Hallazgo en EPOC	Autor
CCL1	Quimioatrayente de monocitos, Células NK y Linfocitos B inmaduros	Frecuencia aumentada del rs2282691 en una cohorte de pacientes japoneses.	Takabatake et ál. 2006 (99).
CSF2	Genera monocitos y macrófagos a partir de precursores celulares	CSF2 -351 se encontró aumentado en pacientes con EPOC en una Cohorte de Xuan Wei, China.	Shen M et ál, 2008 (100).
IL1 β	Activación de macrófagos alveolares	Las células en cultivo, liberan más IL1b posterior a la estimulación con humo de cigarro.	Rusznak et ál., 2000 (97).
IL8	Quimioatrayente de neutrófilos	Altas concentraciones en esputo de pacientes con EPOC.	Keatings et ál., 1996 (101), Yamamoto et ál, 1997 (102).
TNF- α	Mediador en la respuesta inmune frente a bacterias grampositivos.	Niveles aumentados en esputo y lavado bronquioalveolar.	Gan WQ et ál., 2001(104)
IL6	Estimula la diferenciación de células B	Se ha visto aumentado en esputo, lavado bronquioalveolar y plasma en pacientes con EPOC exacerbados.	Bhowmik et ál., 2000 (91), Song W., 2001 (92), Bucchioni et ál., 2003 (93).
PCR	Opsonina inespecífica para fagocitosis de bacterias.	Niveles séricos elevados en pacientes con EPOC y fumadores sin evidencia de enfermedad pulmonar.	Pinto-Plata VM 2006 (90).

Resumen de las funciones de proteínas/genes involucradas en la inflamación y sus hallazgos más importantes.

En cuanto al sistema HLA, podemos decir que a pesar de la contribución de la variación alélica del sistema HLA a un sinnúmero de enfermedades, principalmente de tipo autoinmune e inflamatorio, el papel de los alelos HLA en EPOC no ha sido investigado a detalle. Existe un número limitado de estudios que han descrito dicha asociación (104). Como ya se mencionó anteriormente, la EPOC es una enfermedad pulmonar de corte inflamatorio, en la cual además de factores extrínsecos intervienen factores genéticos que pueden contribuir al desarrollo o progresión de la enfermedad, sin embargo dichos factores no han sido claramente descritos, pese a existir asociaciones de polimorfismos en genes HLA en otras enfermedades respiratorias de tipo inflamatorio como fibrosis pulmonar idiopática (105, 106), neumonitis por hipersensibilidad (107) y asma ocupacional (108). Entre los escasos reportes de asociación de la patología con el sistema HLA se encuentra el estudio de Sugiyama y colaboradores en 1990, quienes tipificaron por métodos serológicos los antígenos HLA-A, B, C, en pacientes con panbronquiolitis difusa (PBD) una forma de EPOC de etiología desconocida, la cual se caracteriza clínicamente por tos crónica, esputo y disnea, fisiológicamente por limitación del flujo aéreo e histológicamente por lesiones inflamatorias alrededor de los bronquiolos, encontrando un incremento en la frecuencia del antígeno HLA-B54 (63% en casos vs 11% en controles). Aunque el número de pacientes en su estudio fue relativamente pequeño, es de mencionar que HLA-B54 es un serotipo que se ha encontrado predominantemente en asiáticos (109); posteriormente Keicho y colaboradores en 1998 describieron una asociación positiva entre PBD y los alelos HLA-A*11, B*54 y Cw*01 mientras que A*33 y B*44 aumentaron sus frecuencias en el grupo de controles, sugiriendo una asociación de protección hacia estos alelos en población japonesa (110); adicionalmente, en coreanos el hallazgo de

HLA-A*11 se replicó, pero B54 y Cw1 no lo hicieron; por el contrario se encontró aumentado HLA-B55 y débilmente asociado B62 y Cw4 (111). Con respecto a población caucásica, el antecedente más antiguo al que hace referencia la literatura, es de Kauffmann y colaboradores, quienes en 1983 demostraron que HLA-B7 es un factor genético de riesgo a desarrollar EPOC, el hallazgo es digno de mención debido a que HLA-B7 es predominante en caucásicos (112); Kasuga y colaboradores en 2005 realizaron un estudio de replicación donde investigaron la asociación tentativa entre HLA-B7 y EPOC descrita por Kauffmann, utilizando un diseño de casos y controles en fumadores, analizaron la contribución de HLA-B7 en la tasa del decline de la función pulmonar, la cual fue medida por el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1); sin embargo no encontraron diferencias significativa en la frecuencia de HLA-B7 entre pacientes con EPOC y grupos de pacientes sin obstrucción de la vía aérea; tampoco encontraron asociación entre HLA-B7 y la tasa de decline de la función pulmonar, estos hallazgos les permiten concluir que HLA-B7 no contribuye al desarrollo de EPOC o está implicado en variaciones en la función pulmonar (104). En lo que respecta a poblaciones latinoamericanas, Canónico y colaboradores, realizaron en 2008 un estudio de asociación de casos y controles, en donde evaluaron la posible susceptibilidad genética asociada a las regiones de HLA clase I (*loci* A, B y C) y II (DR) en población mestiza de Venezuela, incluyeron 50 pacientes ambulatorios con diagnóstico clínico de EPOC, y fueron comparados con 108 sujetos que fungieron como grupo control, sin embargo, dicho grupo control no contó con análisis de las pruebas de función pulmonar (datos de espirometría) y fueron integrados a la investigación solo como patrones de referencia del estudio, por ser una representación fidedigna de la población mestiza venezolana; no encontraron ningún incremento significativo de los

alelos pertenecientes a los loci HLA-A o HLA-B, en tanto que para el locus HLA-C, describen una disminución en la frecuencia del alelo HLA-Cw*03 en los pacientes con respecto a los controles, que no resulta estadísticamente significativa al corregir por la prueba de Bonferroni, además de que no explican porque los controles analizados en este locus son solo 24 individuos de los 108 propuestos inicialmente. De igual manera, para el locus HLA-DRB1, los autores refieren una disminución del alelo HLA-DRB1*07 con respecto a los controles, que, nuevamente no resulta hallazgo que no mostró significancia estadística al corregir por prueba de Bonferroni (113).

5.0 Hipótesis

Las variantes genéticas tipo SNP en genes relacionados a inflamación y daño al DNA, así como polimorfismos en el sistema HLA, son factores de riesgo genético al establecimiento o gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

6.0 Objetivo General

Identificar polimorfismos en genes involucrados en la inflamación y daño al DNA asociados con EPOC.

6.1 Objetivos Particulares

6.1.1. Caracterizar los polimorfismos tipo SNP de genes involucrados en inflamación en pacientes con EPOC y controles fumadores sanos.

6.1.2. Identificar los alelos de los *loci* HLA de clase II (DRB1 y DQB1) en pacientes con EPOC y controles sanos fumadores.

6.1.3. Establecer las posibles correlaciones genotipo/fenotipo con respecto a los estadios GOLD en pacientes con EPOC.

7.0 Participantes

7.1 Población de estudio

Los individuos fueron seleccionados y reclutados de agosto del 2009 a julio del 2010, captados de las clínicas de EPOC, de ayuda para dejar de fumar durante la campaña de detección de EPOC 2009; además, de manera continua en el pabellón de enfermedades obstructivas y consulta externa del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, todos los participantes fueron evaluados por médicos neumólogos especialistas utilizando criterios clínicos y radiológicos. El principal criterio empleado es la espirometría, la cual es la prueba que ayuda a diagnosticar y estadificar la enfermedad, los parámetros de función pulmonar obtenidos en esta prueba son:

FEV1 (Volumen espiratorio forzado en el primer segundo): Es el volumen espirado en el primer segundo desde que inicia la espiración.

FVC (Capacidad vital forzada): Es la cantidad máxima de aire que puede ser espirada de forma forzada tras una inspiración máxima.

FEV1/FVC (relación FEV1/FVC): Es el porcentaje de la capacidad vital forzada que se espira en el primer segundo.

Las mediciones fueron estandarizadas con base en edad, género, población y sus medidas antropométricas, se emplearon los predichos del Dr. Pérez-Padilla, los cuales están estandarizados para población mexicana y precargados en los espirómetros comerciales en México.

7.1.1. Definición de caso y control.

Caso: Pacientes hombres y mujeres mayores de 50 años con EPOC confirmada por diagnóstico clínico y radiológico, con antecedentes de hábito tabáquico mayor de 10 cigarros al día por más de 10 años.

Control: Individuos hombres y mujeres mayores de 50 años, fumadores o exfumadores, con tabaquismo activo por más de 10 años y más de 10 cigarros al día y que tuvieran valores de función pulmonar normales, denominados en adelante con la clave FS.

7.1.2 Criterios de inclusión, no inclusión y eliminación

Criterios de inclusión:

Mestizos mexicanos por abolengo.

Mayores de 50 años de edad.

Fumadores activos que consuman más de 10 cigarros por día y por más de 10 años de manera continua.

Exfumadores que hayan consumido más de 10 cigarros por día y por al menos 10 años de manera continua.

Ser evaluados con exámenes clínicos y radiológicos por parte de neumólogos del INER.

Responder el cuestionario sobre hábito tabáquico y antecedentes hereditarios.

Aceptar y firmar la carta de consentimiento informado creada ex profeso.

Criterios de no inclusión:

Enfermedades pulmonares diferentes a EPOC que alteren la función pulmonar.

Enfermedades de tipo inflamatorio.

Sujetos con contraindicación para realizar la espirometría.

Criterios de eliminación:

Muestra biológica insuficientes o de mala calidad.

Cuestionario de datos incompleto.

Espirometría de calidad C o inferior.

8.0 Metodología

8.1 Obtención de DNA genómico

A partir de células de sangre periférica extraídas por punción venosa, se obtuvo DNA genómico utilizando el estuche comercial *BD tract DNA isolation kit* (Maxim Biotech, San Francisco CA, USA). El DNA se cuantificó por espectrofotometría de absorción de luz ultravioleta a 260 nm de longitud de onda, empleando un equipo ACTGene (ACTGene, Inc., New Jersey, USA). La contaminación con compuestos orgánicos y proteínas se determinó al establecer la relación de las lecturas 260/240 y 260/280 respectivamente; las muestras se consideraron libres de contaminantes cuando en ambos casos la relación se encontró entre 1.7-2.0.

8.2 Tipificación molecular de los alelos HLA clase II.

La amplificación del DNA, así como la identificación específica de los alelos pertenecientes a los *loci* HLA-DRB1/3/4/5 y DQB1 se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la técnica de iniciadores secuencia específica (PCR-SSP) con el sistema de tipificación Fastype HLA-DNA SSP (Bio-synthesis Inc; Texas, USA). Esta metodología ha sido acreditada y certificada por la Sociedad Americana de Histocompatibilidad e Inmunogenética (ASHI).

La tipificación de HLA-DQB1 se realizó por medio de 24 pares de iniciadores de alta resolución, que permiten la identificación de 55 alelos de los grupos HLA-DQ6, HLA-DQ3, HLA-DQ4, HLA-DQ5 y HLA-DQ2. HLA-DRB1 fue determinado en modalidad de baja resolución, la cual cubre los alelos pertenecientes a los genes DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5 en 24 reacciones independientes. Para DR4 permite discriminar los alelos conocidos desde DRB1*04:01 hasta DRB1*04:22. En el caso de DR11, cubre las

especificidades pertenecientes hasta DRB1*11:22, para DR13 hasta DRB1*13:22, para DR14 hasta DRB1*14:21 y para DR8 hasta DRB1*08:11.

En todos los casos (la determinación de los dos *loci* y sus alelos), se coamplificó un fragmento de 410 pb del gen de G3PDH (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa humana), como control interno de amplificación, y en el último tubo de cada serie de reacciones (por *locus* y por alelo especificidades), se incluyó una reacción libre de DNA, como control de contaminación a reacciones previas y a contaminación externa por manipulación. Las condiciones de ciclaje fueron las siguientes:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
96° C	1 min	1
94° C	20 seg	10
65° C	1 min	
94° C	20 seg	25
61° C	50 seg	
72° C	30 seg	
72° C	7 min	1
4° C	∞	Hasta electroforesis

La información de las secuencias y especificidades para los iniciadores de HLA-DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 y DQB1 se obtuvieron del “12^{avo} taller internacional de histocompatibilidad”.

Las reacciones individuales de PCR, en todos los casos, se realizaron con 75 ng de DNA genómico, en una reacción de 10 µl, que contenía 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂ y 60 µM de cada dNTP (114, 115).

Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0.2 µg/ml), por 40 min. (30V/cm) y las bandas amplificadas se visualizaron en el equipo de fotodocumentación BIOTOP (Shanghai Biotech Inc), la imagen fue tomada por medio del software PSRemote v. 1.6.3 en

condiciones estándar según el fabricante, el bandeo fue visualizado empleando el software *Gen Scope* para *BioSens Gel Imaging System v 1.76*, la interpretación fue realizada bajo el auxilio de las hojas de tipificación provistas por el fabricante según fue el caso de cada *locus* (ver anexos 1 y 2).

8.3 Discriminación alélica para genotipificación de SNPs.

Se seleccionaron 8 SNPs en 7 genes con asociación positiva previa a EPOC, los genes incluidos fueron: TNF, CFS2, IL1B, IL8, CCL1, CRP, IL6 y 2 SNPs involucrados en la respuesta al daño al DNA y apoptosis: rs3820928 (*RHBDD1*) y rs935381 (*STK39*).

La discriminación alélica de los SNPs rs16944 (*IL1B*), rs4073 (*IL8*), rs361525 y rs1800629 (*TNF*), rs25882 (*CFS2*), rs2282691 (*CCL1*), rs1800947 (*CRP*), rs1818879 (*IL6*), rs3820928 (*RHBDD1*) y rs935381 (*STK39*) se realizó por medio de PCR en su modalidad de Tiempo Real (PCR-RT), en un equipo 7300 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems, California, USA) con el siguiente programa de ciclaje.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Pre-Read	60° C	1 min	1
	50° C	2 min	1
Cuantificación Absoluta	95° C	10 min	1
	95° C	15 seg	40
	60° C	1 min	
Post-Read	60° C	1 min	1

Se incluyeron 4 controles de contaminación por cada placa, denominados como *No Template Controls* (NTC).

El software utilizado fue el *Sequence Detection Software* versión 1.4. Se crearon 2 archivos, uno para discriminación alélica (extensión .AD) y uno para cuantificación absoluta (extensión .AQ) (ver anexos 3 y 4). Los detectores de señal de fluorescencia

utilizados fueron VIC el cual se asignó para alelo B y FAM que asigno alelo A en todos los casos.

La mezcla maestra de reacción se preparó con los siguientes volúmenes calculados para 96 muestras:

Componentes	Volúmenes
TaqMan Genotyping Master Mix*	220 μ L
SNP Genotyping Assay (específicos de cada SNP)	6.5 μ L
H ₂ O libre de DNAsas y RNAsas	220 μ L
DNA ajustado a 10ng/ μ L	3 μ L

*TaqMan Genotyping Master Mix es un reactivo que contiene: AmpliTaq Gold DNA Polymerase, Desoxinucleotidos trifosfatados (dNTPs) y referencia pasiva ROX.

8.4 Inmunodetección de p53

Se realizó un sub-grupo de estudio, para realizar un análisis de expresión de p53 en linfocitos. La proteína fue extraída a partir de células criopreservadas a -70°C en medio RPMI suplementado con SFT. Se cuantificó la concentración total de proteínas por el método de Lowry y 40 μ g de proteína total se separaron en un gel de poliacrilamida-SDS al 12%. Posteriormente se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con anticuerpo de ratón anti-p53 DO-1 (1 μ g/ml, Santa Cruz Biotechnology) por 2 hrs. Posteriormente el *blot* fue incubado con peroxidasa acoplada a anticuerpo anti-ratón. Finalmente fue revelado por la técnica de quimioluminiscencia. El mismo *blot* se incubó con anticuerpo anti-beta actina (0.5 μ g/ml, Santa Cruz Biotechnology). La cuantificación fue realizada por el sistema Gel Doc (BioRad) utilizando el software *Quantity One*. El análisis comparativo de los blot fue hecho por densitometría óptica normalizado contra actina.

8.5 Análisis Estadístico

Las diferencias entre los dos grupos en estudio fueron evaluadas mediante la determinación y comparación de las frecuencias génicas y haplotípicas encontradas. Se emplearon tablas de contingencia de 2x2 (Ver anexo 5). La significancia estadística se estableció mediante el paquete estadístico Epi Info versión 6.04b, tomando en cuenta los valores de χ^2 . Los resultados se consideraron significativos cuando el valor de p fue <0.05; de igual forma se estimó la razón de momios (OR) con intervalos de confianza del 95%, con el fin de conocer la fuerza de la asociación.

9.0 Resultados

9.1 Población de estudio

Se recolectaron un total de 813 muestras en campaña de detección de EPOC, de las cuales fueron excluidas 483, por no cumplir con los criterios mencionados en la sección 5.1.2, de tal manera que se formaron el grupo de casos (EPOC) y controles (FS), ambos con una n=165 participantes. La descripción de los datos demográficos de dichos grupos se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Datos demográficos de la población en estudio.

Variabes	EPOC n=165	FS n=165
Género		
Masculino	112 (67.8%)	107 (64.8%)
Femenino	53 (32.12%)	58 (35.2%)
Edad	63.96 ± 2.92	58.07 ± 4.63
Índice tabáquico	55 ± 4.8	48.87 ± 1.79

FS= Fumadores Sanos (Grupo control).

9.2 Discriminación alélica de variantes tipo SNP.

Se genotipificaron 8 SNPs en 7 genes involucrados en la respuesta inflamatoria: rs16944 (*IL1B*), rs4073 (*IL8*), rs361525 y rs1800629 (*TNF*), rs25882 (*CFS2*), rs2282691 (*CCL1*), rs1800947 (*CRP*) y rs1818879 (*IL6*), los resultados se pueden observar en las tablas 6-13, de la misma manera se identificaron 2 SNPs involucrados en la respuesta al daño al DNA y apoptosis: rs3820928 (*RHBDD1*) y rs935381 (*STK39*).

En las siguientes tablas se presentan los datos de frecuencias genotípicas y alélicas de SNPs asociados con inflamación:

Tabla 6. Datos de frecuencias genotípicas de SNPs en genes relacionados a inflamación en individuos con EPOC y Fumadores Sanos.

Gen/SNP Genotipo	EPOC		FS		pC	OR	IC 95%
	n= 165	FG (%)	n= 165	FG (%)			
<i>CCL1</i>							
rs2282691							
TA	74	0.448 (44.85)	72	0.44 (43.64)	0.9117	1.05	0.66-1.16
TT	69	0.418 (41.82)	71	0.43 (43.03)	0.9133	0.95	0.60-1.51
AA	22	0.133 (13.33)	22	0.13 (13.33)	0.8713	1.00	0.50-1.99
<i>IL1B</i>							
rs16944							
GA	76	0.46 (46.06)	74	0.45 (44.85)	0.9119	1.05	0.67-1.66
GG	63	0.38 (38.18)	61	0.37 (36.97)	0.9095	1.05	0.66-1.69
AA	26	0.16 (15.76)	30	0.18 (18.18)	0.6599	0.84	0.45-1.56
<i>CRP</i>							
rs1800947							
CC	158	0.96 (95.76)	161	0.98 (97.58)	0.5396	0.56	0.12-2.26
CG	7	0.04 (4.24)	4	0.02 (2.42)	0.5396	1.78	0.44-8.46
GG	0	0.00 (0.00)	0	0.00 (0.00)	---	---	---
<i>CSF2</i>							
rs25882							
TT	101	0.61 (61.21)	109	0.66 (66.06)	0.4231	0.81	0.50-1.30
TC	52	0.32 (31.51)	43	0.26 (26.06)	0.3307	1.31	0.79-2.17
CC	12	0.07 (7.27)	13	0.08 (7.88)	1.00	0.92	0.37-2.26
<i>IL8</i>							
rs4073							
AA	91	0.55 (55.15)	70	0.42 (42.42)	0.0276	1.67	1.06-2.64
AT	57	0.35 (34.55)	68	0.41 (41.21)	0.2564	0.75	0.47-1.20
TT	17	0.10 (10.30)	27	0.16 (16.36)	0.1449	0.59	0.29-18
<i>TNF</i>							
rs361525							
GG	154	0.93 (93.33)	150	0.91 (90.91)	0.5398	1.40	0.58-3.48
AG	10	0.06 (6.06)	15	0.09 (89.09)	0.4053	0.65	0.25-1.59
AA	1	0.01 (0.61)	0	0.00 (0.00)	---	---	---
<i>TNF</i>							
rs1800629							
GG	142	0.86 (86.06)	157	0.95 (95.15)	0.0082	0.31	0.12-0.76
GA	22	0.13 (13.33)	8	0.05 (4.85)	0.0127	3.02	1.24-8.07
AA	1	0.01 (0.61)	0	0.00 (0.00)	---	---	---
<i>IL6</i>							
rs1818879							
GA	69	0.42 (41.82)	94	0.57 (56.97)	0.0082	0.54	0.34-0.86
GG	66	0.40 (40.00)	44	0.27 (26.67)	0.0141	1.83	1.12-3.00
AA	30	0.18 (18.18)	27	0.16 (16.36)	0.7708	1.14	0.62-2.10

Se muestran resultados de los genotipos en orden de frecuencia decreciente en pacientes con EPOC. FS= Fumadores Sanos, FG= Frecuencia genotípica, p= Valor de p con corrección de Yates, OR= Razón de momios, IC= Intervalos de confianza.

Tabla 7. Datos de frecuencias alélicas de SNPs en genes relacionados a inflamación en individuos con EPOC y Fumadores Sanos.

Gen/SNP	EPOC (n= 165)		FS (n= 165)		pC	OR	IC	
	Alelo	n	FA (%)	n				FA (%)
<i>CCL1</i>								
rs2282691								
	T	212	0.64 (64.24)	214	0.65 (64.85)	0.9351	0.97	0.70-1.36
	A	118	0.36 (35.76)	116	0.35 (35.15)	0.9351	1.03	0.74-1.43
<i>IL1B</i>								
rs16944								
	G	202	0.61 (61.21)	196	0.59 (59.39)	0.6907	1.08	0.78-1.49
	A	128	0.39 (38.79)	134	0.41 (40.61)	0.6907	0.93	0.67-1.28
<i>CRP</i>								
rs1800947								
	C	323	0.98 (97.88)	326	0.99 (99.79)	0.5431	0.57	0.12-2.25
	G	7	0.02 (2.12)	4	0.01 (1.21)	0.5431	1.77	0.44-8.30
<i>CFS2</i>								
rs25882								
	T	254	0.77 (76.97)	261	0.79 (79.09)	0.5332	1.15	0.77-1.70
	C	76	0.23 (23.03)	69	0.21 (20.91)	0.5727	1.13	0.77-1.67
<i>IL8</i>								
rs4073								
	A	239	0.72 (72.42)	208	0.63 (63.03)	0.124	1.54	1.09-2.17
	T	91	0.28 (27.58)	122	0.37 (36.97)	0.124	0.65	0.46-0.91
<i>TNF</i>								
rs361525								
	G	318	0.96 (96.36)	315	0.95 (95.45)	0.6943	1.26	0.54-3.00
	A	12	0.04 (3.64)	15	0.05 (4.55)	0.6943	0.79	0.33-1.85
<i>TNF</i>								
rs1800629								
	G	306	0.93 (92.73)	322	0.98 (97.58)	0.0065	0.32	0.12-0.74
	A	24	0.07 (7.27)	8	0.02(2.42)	0.0065	3.16	1.34-8.24
<i>IL6</i>								
rs1818879								
	G	201	0.61 (60.91)	182	0.55 (55.15)	0.1556	1.27	0.92-1.75
	A	129	0.39 (39.09)	148	0.45 (44.85)	0.1556	0.79	0.57-1.09

Se muestran resultados de los alelos en orden de frecuencia decreciente en pacientes con EPOC. FS= Fumadores Sanos, FA= Frecuencia alélica, p= Valor de p con corrección de Yates, OR= Razón de momios, IC= Intervalos de confianza.

En la tabla 8 se presentan los datos de frecuencias genotípicas y alélicas de SNPs asociados con daño al DNA y apoptosis.

Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas de SNPs en genes asociados al daño al DNA en pacientes con EPOC y Fumadores Sanos.

Gen/SNP	EPOC (n=165)		FS (n=165)		pC	OR	IC 95%
	n	FG (%)	n	FG (%)			
<i>RHBDD1</i>							
<i>rs3820928</i>							
Genotipo		FG (%)		FG (%)			
AA	73	0.44 (44.24)	71	0.43 (43.03)	0.9116	1.05	0.66-1.66
GA	40	0.24 (24.24)	43	0.26 (26.06)	0.7996	0.91	0.53-1.54
GG	52	0.32 (31.52)	51	0.31 (30.91)	0.814	0.92	0.57-1.50
Alelo		FA (%)		FA (%)			
A	186	0.52 (51.57)	185	0.54 (53.55)	1	1.01	0.74-1.39
G	144	0.48 (48.43)	153	0.46 (46.45)	1	0.99	0.72-1.36
<i>STK39</i>							
<i>rs935381</i>							
Genotipo		FG (%)		FG (%)			
GG	73	0.44 (44.24)	66	0.40 (40.03)	0.5035	1.19	0.75-1.89
GA	40	0.24 (24.24)	43	0.26 (26.06)	0.7996	0.91	0.53-1.54
AA	52	0.32 (31.52)	56	0.34 (33.91)	0.7248	0.9	0.55-1.46
Alelo		FA (%)		FA (%)			
G	186	0.56 (56.36)	175	0.53 (53.03)	0.4342	1.14	0.83-1.57
A	144	0.44 (43.64)	155	0.45 (44.77)	0.4342	0.87	0.64-1.20

FS= Fumadores Sanos, FG= Frecuencia genotípica, p= Valor de p con corrección de Yates, OR= Razón de momios, IC= Intervalos de confianza.

De los 8 SNPs analizados involucrados en la respuesta inflamatoria, los rs1800629 (*TNF*), rs1818879 (*IL6*) y rs4073 (*IL8*) tuvieron una asociación positiva. Se encontró una frecuencia genotípica del rs1800629 para el genotipo GA de 13% en casos contra 5% en controles (pC=0.0127, OR=3.02, IC 95%=1.24-8.07), esta tendencia se mantuvo en la frecuencia alélica del alelo A en 7% para casos contra 2% en controles (pC =0.0065, OR=3.16, IC 95%=1.34-8.24). Otro SNP en el que se observó una asociación fue el rs1818879 en *IL6*, en este polimorfismo existió una frecuencia génica del 40% en controles contra 27% de casos (pC=0.0141, OR=1.83, IC 95%=1.12-3.00), en las frecuencias alélicas de este SNP no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa, esto debido a que la distribución de estos alelos en nuestra población son muy similares. Finalmente el

rs4073 en *IL8*, mostró una asociación positiva para el alelo A con 72% en casos contra 63% en controles ($pC=0.0124$, $OR=1.54$, $IC\ 95\%=1.09-2.17$), sin embargo cuando se analizaron los genotipos no se halló ninguna diferencia en las frecuencias. Con respecto al resto de los polimorfismos no se encontró diferencia estadísticamente significativa, aun así, las frecuencias observadas corresponden a las reportadas en las bases de datos, lo que certifica la similitud poblacional entre los individuos incluidos en el estudio.

Por otra parte, se analizaron 2 SNP asociados con daño al DNA y apoptosis el rs3820928 en *RHBDD1* y el rs935381 en *STK39* en ambos casos no se observa ninguna diferencia estadísticamente significativa (tabla 8).

9.3 Genotipificación de HLA

La caracterización HLA-DRB1 y DQB1 se realizó por PCR de punto final en modalidad de iniciadores de secuencia específica (PCR-SSP) en resolución intermedia y alta. Los pacientes que se incluyeron en el estudio fueron procedentes de la consulta externa y de la clínica de EPOC del INER ($n=165$), los controles fueron individuos clínicamente sanos ($n= 165$) fumadores con valores de función pulmonar normal. Se lograron determinar 13 alelos DRB1. Los alelos DRB1*04, 08, y 14 se encontraron en una frecuencia elevada (30%, 15% y 12% respectivamente) lo cual es consistente con reportes previos, que indican a estos alelos, como frecuentes en nuestra población. Las frecuencias alélicas son similares entre ambos grupos, mostrando homogeneidad entre dichos grupos (tabla 9).

Por otro lado, como se puede ver en la tabla 15 se determinaron 15 alelos DQB1, encontrándose los alelos *03:02:01/02, *03:01:01/02 y 04:02 con una mayor frecuencia. Al igual que para el caso de los alelos DRB1, estos alelos son

frecuentes en nuestra población. Interesantemente, el alelo 06:03, muestra una diferencia estadísticamente significativa (3.63% vs 7.58%, $pC= 0.042$, $OR=0.46$ IC 95%= 0.21 - 0.97), resultados que son sugerentes de un efecto de protección (tabla 10).

Tabla 9. HLA-DRB1* en pacientes con EPOC secundaria a tabaquismo y grupo control.

Alelo DRB1	EPOC		FS		pC	OR	IC (95%)
	n= 165	FA (%)	n=165	FA (%)			
*04	98	0.297 (29.70)	98	0.296 (29.69)	0.932	1.00	0.71 - 1.42
*08	48	0.145 (14.55)	51	0.154 (15.45)	0.827	0.93	0.59 - 1.49
*14	39	0.118 (11.82)	40	0.121 (12.12)	0.568	1.17	0.71 - 1.93
*07	30	0.090 (9.09)	21	0.063 (6.36)	0.243	1.47	0.79 - 2.77
*11	29	0.087 (8.79)	20	0.060 (6.06)	0.234	1.49	0.80 - 2.85
*01	20	0.60 (6.06)	19	0.057 (5.75)	1.000	1.06	0.52 - 2.14
*13	18	0.054 (5.45)	24	0.072 (7.27)	0.425	0.74	0.37 - 1.45
*03	17	0.051 (5.15)	14	0.042 (4.24)	0.712	1.23	0.56 - 2.74
*15	14	0.042 (4.24)	17	0.051 (5.15)	0.712	0.82	0.37 - 1.79
*16	10	0.030 (3.03)	13	0.039 (3.93)	0.671	0.76	0.29 - 1.91
*10	5	0.015 (1.52)	8	0.024 (2.42)	0.575	0.62	0.16 - 2.17
*09	1	0.003 (0.30)	2	0.006 (0.60)	1.000	0.50	0.01 - 9.63
*12	1	0.003 (0.30)	3	0.009 (0.90)	0.623	0.33	0.01 - 4.16

Se presentan las frecuencias alélicas de los alelos HLA-DRB1 entre los grupos participantes, FA= Frecuencia génica, FS= Individuos fumadores sanos (controles), pC= Valor de p con corrección de Yates, OR= Razón de momios, IC (95%)=Intervalos de confianza al 95%.

Tabla 10. HLA-DQB1* en pacientes con EPOC secundaria a tabaquismo y grupo control.

Alelo DQB1	EPOC		FS		pC	OR	IC (95%)
	n= 165	FA (%)	n=165	FA (%)			
*03:02:01/02	96	0.291 (29.09)	99	0.300 (30.00)	0.864	0.96	0.68 - 1.36
*03:01:01/02	82	0.248 (24.84)	78	0.236(23.64)	0.785	1.07	0.74 - 1.55
*04:02	49	0.148 (14.84)	50	0.151 (15.15)	1.000	0.98	0.62 - 1.53
*05:01:01/02	25	0.075 (7.57)	27	0.081 (8.18)	0.885	0.92	0.50 - 1.69
*02:02	24	0.072 (7.27)	21	0.063 (6.36)	0.757	0.15	0.60- 2.23
*02:01	18	0.054 (5.45)	13	0.039 (3.94)	0.461	1.41	0.64 - 3.18
*06:03	12	0.036 (3.63)	25	0.075 (7.58)	0.042	0.46	0.21 - 0.97
*06:02	10	0.030 (3.03)	5	0.015 (1.52)	0.296	2.03	0.62 - 7.65
*03:03	6	0.018 (1.81)	3	0.009 (0.91)	0.504	2.02	0.43 - 12.57
*05:02:01/02	4	0.012 (1.21)	1	0.003 (0.30)	0.373	4.04	0.40 - 199.40
*06:01:01/03	2	0.006 (0.60)	1	0.003 (0.30)	1.000	2.01	0.10 - 118.71
*05:03:01/02	1	0.003 (0.30)	0	---	---	---	---
*06:04	1	0.003 (0.30)	3	0.009 (0.91)	0.623	0.33	0.01 - 4.16
*03:04	0	---	3	0.009 (0.91)	---	---	---
*06:09	0	---	1	0.003 (0.30)	---	---	---

Se presentan las frecuencias alélicas de los alelos HLA-DQB1 entre los grupos participantes, FA= Frecuencia alélica, FS= Individuos fumadores sanos (controles), pC= Valor de p con corrección de Yates, OR= Razón de momios, IC (95%)=Intervalos de confianza al 95%.

Tabla 11. Comparación de los alelos DRB1 con estadio GOLD I

Alelo DRB1	EPOC		FS		pC	OR	IC (95%)
	n= 7	FA (%)	n= 165	FA(%)			
*04	7	0.500 (50.0)	98	0.296 (29.69)	0.137	2.37	0.69-8.12
*08	2	0.142 (14.29)	51	0.154 (15.45)	1.000	0.91	0.10-4.28
*01	1	0.071 (7.14)	19	0.057 (5.75)	0.574	1.26	0.03-9.27
*15	2	0.142 (14.29)	17	0.051 (5.15)	0.176	3.07	0.31-15.51
*16	2	0.142 (14.29)	13	0.039 (3.93)	0.119	4.06	0.40-21.28
Otros	0	---	132	0.400 (40.0)	---	---	---

FA= Frecuencia alélica, FS= Individuos fumadores sanos (controles), pC= Valor de p con corrección de Yates, OR= Razón de momios, IC (95%)=Intervalos de confianza al 95%.

Tabla 12. Comparación de los alelos DRB1 con estadio GOLD II

Alelo DRB1	EPOC		FS		pC	OR	IC (95%)
	n= 84	FA (%)	n= 165	FA (%)			
*04	52	0.309 (30.95)	98	0.296 (29.69)	0.724	1.1	0.72-1.68
*08	28	0.166 (16.67)	51	0.154 (15.45)	0.740	1.13	0.65-1.91
*14	17	0.101 (10.11)	40	0.121 (12.12)	0.670	0.84	0.43-1.57
*07	9	0.053 (5.35)	21	0.063 (6.36)	0.854	0.85	0.34-2.00
*11	21	0.125 (12.50)	20	0.060 (6.06)	0.017	2.28	1.13-4.57
*01	13	0.077 (7.73)	19	0.057 (5.75)	0.466	1.41	0.62-3.10
*13	7	0.041 (4.16)	24	0.072 (7.27)	0.271	0.57	0.20-1.40
*03	10	0.059 (5.95)	14	0.042 (4.24)	0.496	1.47	0.57-3.64
*15	3	0.017 (1.78)	17	0.051 (5.15)	0.128	0.34	0.06-1.21
*16	5	0.029 (2.97)	13	0.039 (3.93)	0.808	0.77	0.21-2.34
*10	2	0.011 (1.19)	8	0.024 (2.42)	0.508	0.5	0.05-2.53
*09	1	0.005 (0.59)	2	0.006 (0.60)	1.000	1.01	0.02-19.46
*12	0	---	3	0.009 (0.90)	---	---	---

FA= Frecuencia alélica, FS= Individuos fumadores sanos (controles), pC= Valor de p con corrección de Yates, OR= Razón de momios, IC (95%)=Intervalos de confianza al 95%.

Tabla 13. Comparación de los alelos DRB1 con estadio GOLD III.

Alelo DRB1	EPOC		FS		pC	OR	IC (95%)
	n= 35	FA (%)	n= 165	FA (%)			
*04	16	0.228 (22.86)	98	0.296 (29.69)	0.3145	0.7	0.36-1.32
*08	7	0.100 (10.00)	51	0.154 (15.45)	0.3219	0.61	0.22-1.43
*14	13	0.185 (18.57)	40	0.121 (12.12)	0.2106	1.65	0.76-3.40
*07	12	0.171 (17.14)	21	0.063 (6.36)	0.0061	3.04	1.29-6.88
*11	6	0.085 (8.57)	20	0.060 (6.06)	0.4267	1.45	0.42-3.94
*01	1	0.0143 (1.43)	19	0.057 (5.75)	0.2224	0.24	0.01-1.55
*13	7	0.100 (10.00)	24	0.072 (7.27)	0.5967	1.42	0.49-3.58
*03	1	0.0143 (1.43)	14	0.042 (4.24)	0.4857	0.33	0.01-2.22
*15	5	0.071 (7.114)	17	0.051 (5.15)	0.5616	1.42	0.39-4.18
*16	1	0.014 (1.43)	13	0.039 (3.93)	0.4798	0.35	0.01-2.43
*10	1	0.01 (1.42)	8	0.024 (2.42)	1.000	0.58	0.01-4.48
Otros	0	0.003 (0.30)	5	<0.010 (1.00)	---	---	---

FA= Frecuencia alélica, FS= Individuos fumadores sanos (controles), pC= Valor de p con corrección de Yates, OR= Razón de momios, IC (95%)=Intervalos de confianza al 95%.

53

Tabla 14. Comparación de los alelos DRB1 con estadio GOLD IV.

Alelo DRB1	EPOC		FS		pC	OR	IC (95%)
	n= 8	FA (%)	n= 165	FA (%)			
*04	5	0.312 (31.25)	98	0.296 (29.69)	1.000	1.08	0.29-3.47
*08	2	0.125 (12.50)	51	0.154 (15.45)	1.000	0.78	0.08-3.57
*14	2	0.125 (12.50)	40	0.121 (12.12)	1.000	1.04	0.11-4.77
*07	2	0.125 (12.50)	21	0.063 (6.36)	0.288	2.1	0.22-10.12
*11	1	0.062 (6.25)	20	0.060 (6.06)	1.000	1.03	0.02-7.42
*01	3	0.187 (18.75)	19	0.057 (5.75)	0.728	3.78	0.63-15.41
*03	1	0.062 (6.25)	24	0.072 (7.27)	0.516	1.5	0.03-11.25
Otros	0		57	<0.043 (4.30)			

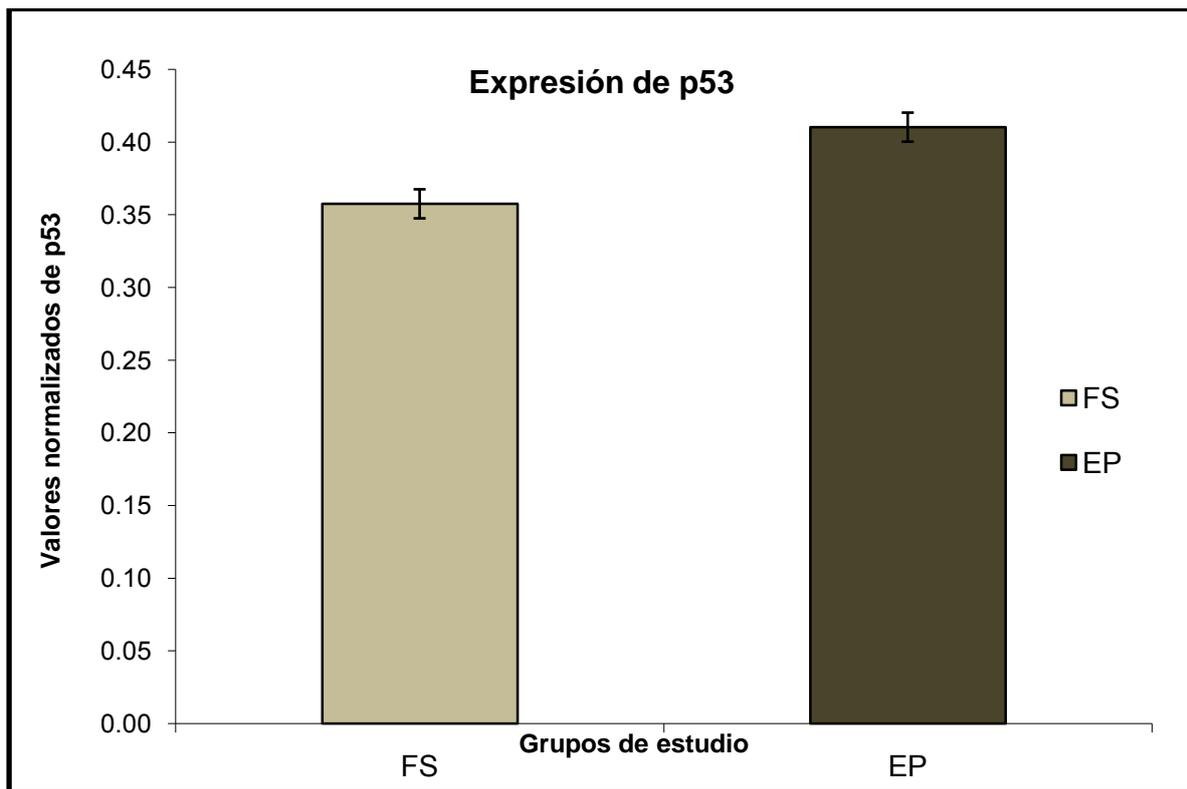
FA= Frecuencia alélica, FS= Individuos fumadores sanos (controles), pC= Valor de p con corrección de Yates, OR= Razón de momios, IC (95%)=Intervalos de confianza al 95%.

Posteriormente se realizó la estratificación de pacientes en relación al estadio GOLD, se encontraron 6 alelos diferentes en el estadio I, las frecuencias alélicas en ambos grupos mostraron un comportamiento similar en cuanto a las frecuencias reportadas en mestizos-mexicanos, no habiendo diferencia estadísticamente significativa (tabla 11). Para el estadio II, se lograron determinar un total de 13 alelos, siendo los alelos más frecuentes DRB1*04, 08 y 14, en ambos grupos. Interesantemente el alelo DRB1*11 se mostró aumentado el grupo de casos en relación de los controles (12.5% vs 6.06%, $pC=0.017$, $OR=2.28$, $IC\ 95\%= 1.13-4.57$) (tabla 12). En el estadio III, se determinaron 12 alelos, de igual manera que para el caso del estadio II, DRB1*04, 08 y 14 fueron en orden decreciente los más frecuentes; el alelo DRB1*07 se encontró aumentado en el grupo de casos en relación a controles (17.14% vs 6.36% $pC=0.0061$, $OR=3.04$, $IC\ 95\%= 1.29-6.88$) dando una diferencia estadísticamente significativa (tabla 13). Para el estadio IV se lograron diferenciar 9 alelos, pese a no encontrar ninguna diferencia en cuanto a frecuencias alélicas, el alelo DRB1*01 mostró una tendencia (18.75% vs 5.75%) sin embargo al momento de realizar la corrección de Yates en el análisis estadístico el valor de p , no mostró una diferencia estadísticamente significativa, probablemente debido al reducido tamaño de muestra (tabla 14).

9.4 Inmunodetección de p53

Los resultados obtenidos en la inmunodeterminación de p53, se presentan en la gráfica 1.

Gráfica 1. Análisis de los niveles de la proteína p53.



Los valores de p53 obtenidos fueron normalizados contra proteína actina, se presenta la densidad óptica de las bandas en unidades arbitrarias. Barra oscura pacientes con EPOC y barra clara controles no fumadores.

55

Después del análisis por densitometría, se puede observar que no existe diferencia en cuanto a la expresión de la proteína supresora de tumores p53, entre los grupos de casos y controles. Cabe señalar que la evaluación de p53 se realizó en una muestra reducida, por lo que se sugiere incrementar el número de muestra para que estos datos sean concluyentes.

10.0 Discusión

La EPOC, es una enfermedad con un componente inflamatorio ampliamente documentado y que ha sido sustentado en diferentes investigaciones, sin embargo, dado el carácter transversal de la mayoría de los estudios realizados y las posibles confusiones de una serie de factores externos relacionados al estilo de vida asociado con los niveles de los biomarcadores inflamatorios, los cuales a su vez, son generalmente inespecíficos, no está del todo claro si estas proteínas son simplemente marcadores del proceso inflamatorio que acompaña a las enfermedades crónicas como la EPOC o si desempeñan un papel importante dentro de la patogénesis de la enfermedad. Por un lado, existen trabajos que demuestran la existencia de dichos biomarcadores de inflamación sistémica en pacientes con EPOC y que además muestran inflamación local, lo que demuestra que si bien la EPOC es una enfermedad de corte inflamatorio aun no existen trabajos que demuestren la participación de la inflamación sistémica en la misma, así como experimentos en los cuales se pueda describir un mecanismo por el cual los mediadores inflamatorios que se han descrito, participen en la patología.

Adicionalmente, debemos tomar en cuenta, que la EPOC, es una enfermedad multifactorial de la cual se han establecido diferentes teorías acerca de su iniciación y progresión, incluyendo teorías inmunológicas, bioquímicas y genéticas.

En el presente trabajo resultaron con una diferencia estadísticamente significativa 3 SNP en genes relacionados con inflamación: rs1800629 en *TNF*, rs4073 en *IL8* y rs1818879 en *IL6*. A este respecto, $TNF-\alpha$ es una de las moléculas que se han estudiado ampliamente en EPOC, el cual tiene funciones como mediador en la respuesta inmune frente a bacterias grampositivas, amplifica la inflamación por medio de la regulación de diferentes genes, además de relacionarse con algunos efectos sistémicos de la enfermedad; existen estudios que han demostrado cierta

relación entre trastornos metabólicos y niveles elevados de TNF- α (116), se asocia con metabolismo acelerado y como con enfermedades crónico debilitantes, resultando en pérdida de peso, de proteínas de músculo esquelético y tejido adiposo (49).

Con respecto a estudios de asociación genética, previamente se ha descrito un SNP en la región promotora del gen de TNF, que ha sido identificado, por afectar directamente la regulación transcripcional del gen (117). También se han asociado ya algunos polimorfismos de este gen con enfermedades pulmonares de corte inmunológico, Kieszko y colaboradores demostraron asociación de TNF-308 G/A con síndrome de Löfgren, el cual es un tipo de sarcoidosis común en población del norte de Europa (118). Por otro lado, Kumar y su grupo de trabajo encontraron asociación entre el mismo polimorfismo y asma bronquial no así en pacientes con tuberculosis en población de la India (119). Con referencia a estudios de asociación genética y EPOC, existen estudios que muestran cierta relevancia para el SNP TNF-308G/A en poblaciones Asiáticas pero no en poblaciones Caucásicas. En Japoneses y Taiwanesees se ha visto un incremento en la prevalencia de EPOC en relación con sus respectivos grupos control (119), sin embargo, estos resultados no han sido confirmados en otras poblaciones y dada la localización del gen del TNF en la región de HLA sería importante establecer la existencia de haplotipos extendidos que incluyan los genes clásicos de HLA (120). TNF- α activa al factor de transcripción NF- κ B, el cual activa la transcripción de genes inflamatorios, incluyendo quimiocinas, interleucinas y proteasas, en células epiteliales y macrófagos (122). Otro polimorfismo que se encontró asociado a la enfermedad fue el rs1818879 en *IL6*, la interleucina 6 codificada por dicho gen es una citocina pleiotrópica proinflamatoria e inmunomoduladora, secretada por células epiteliales, macrófagos alveolares, adipocitos y miocitos así como en otros tejidos y células (123,124), a través de la

activación de NF- κ B (factor que como ya se mencionó anteriormente es activado por TNF- α). La importancia potencial de IL6 en la patogénesis de EPOC, se ha sugerido por estudios que ha mostrado un incremento en los niveles séricos y/o en esputo y que se ha asociado con daño pulmonar o decline acelerado de la función pulmonar (123,124). IL6 también ha sido relacionada con debilitamiento del músculo esquelético (125) así como con exacerbaciones (94) e infecciones pulmonares (126) en pacientes con EPOC. Además, la sobreexpresión de IL6 en pulmón de ratón ha resultado en inflamación de la vía y ensanchamiento del espacio aéreo (127). IL6 es un importante mediador de la respuesta de fase aguda y puede regular transcripcionalmente los niveles de CRP (128). Por su parte, CRP ha sido asociada con alteración en los niveles de la función pulmonar en individuos sanos y/o decline de función pulmonar en EPOC secundaria a tabaquismo (129, 130). En conjunto, estos datos apoyan que el gen de *IL6* es un candidato atractivo para evaluar el daño a la función pulmonar y EPOC. El gen de *IL6* se localiza en la banda citogenética 7p21. Reportes previos han identificado SNPs funcionales en la región promotora (131). Córdoba-Lanus y colaboradores describieron una asociación entre el polimorfismo -572C en *IL6* y EPOC en población española (132). Por otro lado, otro de los SNPs que resultaron asociados en este trabajo fue el rs4073 en *IL8*. Esta quimiocina es uno de los principales mediadores de la respuesta inflamatoria y se sabe que es uno de las principales quimioatrayentes de neutrófilos. Es secretada por diversos tipos de células como macrófagos y células epiteliales. *IL8* es también liberada de macrófagos alveolares en hipoxia y este mecanismo puede ser relevante en EPOC grave y en exacerbaciones (133) Su función en EPOC aún es incierta, aunque hay estudios de asociación tanto genética como de niveles séricos y/o plasmáticos con esta enfermedad. Por ejemplo, Yamamoto y su grupo de trabajo reportaron también valores elevados en esputo en pacientes con EPOC en

comparación a diferentes grupos control (102). Consistente con este hallazgo Keatings y colaboradores, describieron valores elevados de IL8 en esputo inducido de pacientes con EPOC en comparación a diferentes grupos control, (101). En cuanto a asociaciones de polimorfismos con la enfermedad, Jeremy Hull *et al* (2001), encontraron asociado al polimorfismo IL8-251A con bronquiolitis en un estudio de familias realizado en el Reino Unido (134). Aun así no existen estudios que propongan el papel que desempeñan estos polimorfismos a la enfermedad. Recientemente, Alfredo de Diego y sus colaboradores realizaron un estudio en Valencia, España, en el cual determinaron los valores en esputo de diferentes citocinas, entre ellas IL8, resultando dichos valores elevados. Adicionalmente cultivaron células epiteliales-bronquiales, las cuales estimularon con extracto de humo de cigarro, con el objeto de medir los niveles de RNAm, resultando aumentada la cantidad de RNAm de IL8 y TNF, lo cual sugiere que estas moléculas pueden incrementarse en la EPOC, en respuesta al estímulo del humo de cigarro (135).

Con respecto a los alelos del sistema HLA, como ya se mencionó anteriormente, resultaron asociados 2 alelos de HLA-DRB1 con diferentes estadios de la enfermedad (*11 con estadio II y *07 con estadio III).

Se sabe que HLA es dividido en dos clases en relación a su función; los antígenos de clase I están involucrados en la presentación de péptidos, predominantemente derivados de proteínas intracelulares, a células T CD8+ citotóxicas y los antígenos HLA clase II que son funcionalmente especializados para la presentación de fragmentos proteicos cortos, principalmente derivados de proteínas extracelulares a los TCR en células Th CD4+ (136). En cuanto a estudios de asociación genética con HLA y enfermedades pulmonares crónicas, se han encontrado relación entre alelos de este sistema y fibrosis pulmonar idiopática (105, 106) neumonitis por hipersensibilidad (107) y asma ocupacional (108) las cuales son enfermedades de

un corte similar a la EPOC. Se han realizado investigaciones que tratan de buscar la asociación entre HLA y EPOC, sin embargo, no se realizó una estratificación por estadios de la enfermedad, ni una adecuada selección del grupo control, lo cual da relevancia a los hallazgos obtenidos en esta investigación ya que la selección rigurosa de nuestros grupos de estudio así como el tamaño muestra utilizada. Dentro de los pocos estudios realizados en población latinoamericana, se encuentra el realizado por Canónico en 2008, en población venezolana, en el que buscaron la posible asociación de HLA clase I con la enfermedad, no encontrando relación. Las principales investigaciones enfocadas a determinar las funciones de la inmunidad adaptativa en EPOC correlacionan con la gravedad de la obstrucción y se han observado diferentes asociaciones entre células T circulantes y la fisiología pulmonar en pacientes con la enfermedad (137). Por otro lado, tomando en cuenta la función biológica de las moléculas HLA (procesamiento antigénico), no hay estudios disponibles en relación a procesos infecciosos pulmonares en pacientes con EPOC y este sistema, por lo que una perspectiva de este trabajo es la de extender el análisis a la clase I, así como relacionar a exacerbaciones de tipo infeccioso y a agentes etiológicos.

11.0 Conclusión

Nuestros hallazgos sugieren la existencia de factores genéticos tipo SNP en los genes que se sabe participan en el proceso inflamatorio crónico característico de la EPOC (*TNF*, *IL8* e *IL6*), además de alelos de HLA clase II DRB1*11 y DRB1*07 que se encuentran en frecuencias incrementadas en los estadios GOLD II y III respectivamente. Tomando como base los resultados obtenidos en este trabajo, se puede realizar estudios de expresión de estas moléculas en tejido pulmonar, con el fin de establecer las posibles correlaciones con la enfermedad, entendiendo que esta es una enfermedad multifactorial, en la cual se deben tomar en cuenta factores de regulación epigenética, interacciones gen-gen y ambientales que pueden intervenir en la patología.

12.0 Referencias Bibliográficas

1. Barnes PJ, Cosio MG. Characterization of T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS Med* 2004; 1: e20. PMID 15526047.
2. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, *et ál.* Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med.* 2000;343(2):78-85. PMID 10891514.
3. Ciencewicky J, Trivedi S, Kleeberger SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(3):456-68. PMID 18774381.
4. Ezzati M, Kammen DM. The health impacts of exposure to indoor air pollution from solid fuels in developing countries: knowledge, gaps, and data needs. *Environ Health Perspect.* 2002;110(11):1057-68. PMID 12417475.
5. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J.* 2003;22(4):672-88: PMID 11463370.
6. Pauwels RA, Buist AS, Ma P, Jenkins CR, Hurd SS; GOLD Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: National Heart, Lung, and Blood Institute and World Health Organization Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD): executive summary. *Respir Care.* 2001;46(8):798-825. PMID 11463370.
7. Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(6):1304-9. PMID 11371392.
8. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2000 27;343(4):269-80. PMID 10911010.
9. Gelb AF, Hogg JC, Müller NL, Schein MJ, Kuei J, Tashkin DP, Epstein JD, *et ál.* Contribution of emphysema and small airways in COPD. *Chest.* 1996;109(2):353-9. PMID 8620705.
10. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, *et ál.* The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2004 24;350(26):2645-53. PMID 15215480.
11. Takizawa H, Tanaka M, Takami K, Ohtoshi T, Ito K, Satoh M, Okada Y, *et ál.* Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium

- from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(6):1476-83. PMID 11371421.
12. Chen G, Grotendorst G, Eichholtz T, Khalil N. GM-CSF increases airway smooth muscle cell connective tissue expression by inducing TGF-beta receptors. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284:548-556. PMID 12471017.
13. Tuder RM, Yoshida T, Arap W, Pasqualini R, Petrache I. State of the art. Cellular and molecular mechanisms of alveolar destruction in emphysema: an evolutionary perspective. *Proc Am Thorac Soc*. 2006; 3(6):503-10. PMID 16921129.
14. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS: Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/ WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163: 1256-1276: PMID 11316667.
15. Sin DD, Anthonisen NR, Soriano JB, Agustí AG. Mortality in COPD: Role of comorbidities. *Eur Respir J*. 2006; 28(6):1245-57. PMID 17138679.
16. Hogg JC, Senior RM. Chronic obstructive pulmonary disease - part 2: pathology and biochemistry of emphysema. *Thorax*. 2002; 57(9):830-4. PMID 12200530.
17. Alberg A. The influence of cigarette smoking on circulating concentrations of antioxidant micronutrients. *Toxicology* 2002; 180: 121–137. PMID 12324189.
18. de Burbure CY, Heilier JF, Nève J, Becker A, Albrecht C, Borm PJ, Gromadzinska J, *et ál*. Lung permeability, antioxidant status, and NO₂ inhalation: a selenium supplementation study in rats. *J Toxicol Environ Health A*. 2007;70(3-4):284-94. PMID 17365591.
19. Uchida K, Shiraishi M, Naito Y, Torii Y, Nakamura Y, Osawa T. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J Biol Chem*. 1999 274(4):2234-42. PMID 9890986.
20. Wang H, Liu X, Umino T, *et ál*. Cigarette smoke inhibits human bronchial epithelial cell repair processes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25: 772–779. PMID 11726404.
21. Williams AS, Issa R, Leung SY, Nath P, Ferguson GD, Bennett BL, Adcock IM, *et ál*. Attenuation of ozone-induced airway inflammation and hyper-responsiveness by c-Jun NH₂ terminal kinase inhibitor SP600125. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322(1):351-9. PMID 17460151.

22. Tsukagoshi H, Kawata T, Shimizu Y, Ishizuka T, Dobashi K, Mori M. 4-Hydroxy-2-nonenal enhances fibronectin production by IMR-90 human lung fibroblasts partly via activation of epidermal growth factor receptor-linked extracellular signal-regulated kinase p44/42 pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002;184(3):127-35. PMID 12460740.
23. Laurell CB, Eriksson S. The electrophoretic α 1-globulin pattern of serum in α 1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest* 1963; 15:132–140. PMID 3874723.
24. Gross P, Pfitzer EA, Tolker E, Babyak MA, Kaschak M. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. *Arch Environ Health* 1965; 11:50–58. PMID 14312390.
25. Owen CA. Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2008; 3(2):253-68. PMID 18686734.
26. Owen C. Chemokine receptors in airway disease: which receptors to target? *Pulm Pharmacol Ther* 2001; 14:193–202. PMID 11448146.
27. Barrett AJ. The many forms and functions of cellular proteinases. *Fed Proc* 1980; 39:9-14. PMID 6985872.
28. Dhami R, Gilks B, Xie C, Zay K, Wright JL, Churg A. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown is mediated by neutrophils and prevented by alpha1-antitrypsin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 244–252. PMID 10657946.
29. Janoff A, Carp H. Possible mechanisms of emphysema in smokers: cigarette smoke condensate suppresses protease inhibition in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1977; 116: 65-72. PMID 301725.
30. Janoff A, George-Nascimento C, Rosenberg S. A genetically engineered, mutant human alpha-1-proteinase inhibitor is more resistant than the normal inhibitor to oxidative inactivation by chemicals, enzymes, cells, and cigarette smoke. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 353–356. PMID 3006558.
31. Stockley RA. Neutrophils and the pathogenesis of COPD. *Chest* 2002; 121: 151s–155s. PMID 12010844.
32. Larsson C, Eriksson S, Dirksen H. Smoking and intermediate alpha1-antitrypsin deficiency and lung function in middle-aged men. *Br Med J.* 1977 Oct 8; 2(6092):922-5. PMID 303135.
33. Lomas DA. Loop-sheet polymerization: the structural basis of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Clin Sci.* 1994;86(5):489-95. PMID 8033502.

34. Stoller JK, Snider GL, Brantly ML, Fallat RJ, Stockley RA, Turino GM, Konietzko N, *et ál.* American Thoracic Society; European Respiratory Society. [American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency]. *Pneumologie*. 2005; 59(1):36-68. PMID 15685488.
35. Emeo DL, Sandhaus RA, Barker AF, Brantly ML, Eden E, McElvaney NG, Rennard S, *et ál.* Determinants of airflow obstruction in severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *Thorax*. 2007; 62(9):806-13. PMID 17389752.
36. Fregonese L, Stolk J, Frants RR, Veldhuisen B. Alpha-1 antitrypsin Null mutations and severity of emphysema. *Respir Med*. 2008; 102(6):876-84. PMID 18353624.
37. Vidal R, Blanco I, Casas F, Jardí R, Miravittles M; Committee on the National Registry of Individuals with Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. [Guidelines for the diagnosis and management of alpha-1 antitrypsin deficiency]. *Arch Bronconeumol*. 2006 ,(12):645-59. PMID 17178069.
38. Dahl M, Hersh CP, Ly NP, Berkey CS, Silverman EK, Nordestgaard BG. The protease inhibitor PI*S allele and COPD: a meta-analysis. *Eur Respir J*. 2005;(1):67-76. PMID 15994391.
39. Fabbretti G, Sergi C, Consales G, Faa G, Brisigotti M, Romeo G, Callea F. Genetic variants of alpha-1-antitrypsin (AAT). *Liver*. 1992;296-301. PMID 1447962.
40. Gaillard MC, Zwi S, Nogueira CM, Ludewick H, Feldman C, Frankel A, Tsilimigras C, *et ál.* Ethnic differences in the occurrence of the M1 (ala213) haplotype of alpha-1-antitrypsin in asthmatic and non-asthmatic black and white South Africans. *Clin Genet*. 1994; (3):122-7. PMID 7913005.
41. Gupta J, Bhadoria DP, Lal MK, Kukreti R, Chattopadhaya D, Gupta VK, Dabur R, *et ál.* Association of the PIM3 allele of the alpha-1-antitrypsin gene with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Biochem*. 2005; (5):489-91. PMID 15820782.
42. Kalsheker N, Morley S, Morgan K. Gene regulation of the serine proteinase inhibitors alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin. *Biochem Soc Trans*. 2002 (2):93-8. PMID 12023832.
43. Sallenave JM, Si Tahar M, Cox G, Chignard M, Gauldie J. Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils. *J Leukoc Biol*. 1997 (6):695-702. PMID 9201260.

44. Hollander C, Westin U, Wallmark A, Piitulainen E, Sveger T, Janciauskiene SM. Plasma levels of alpha1-antichymotrypsin and secretory leukocyte proteinase inhibitor in healthy and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) subjects with and without severe alpha1-antitrypsin deficiency. *BMC Pulm Med.* 2007;7:1. PMID 17261175.
45. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002; 296(5566):301-5. PMID 11951032.
46. Ishii KJ, Suzuki K, Coban C, Takeshita F, Itoh Y, Matoba H, Kohn LD, *et ál.* Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *J Immunol* 2001; 167: 2602–2607. PMID 11509601.
47. Tsumakidou M, Tzanakis N, Kyriakou D, Chrysofakis G, Siafakas NM. Inflammatory cell profiles and T-lymphocyte subsets in chronic obstructive pulmonary disease and severe persistent asthma. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:234–240. PMID 14987303.
48. Chrysofakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D, Tsumakidou M, Tsiligianni I, Klimathianaki M, Siafakas NM. Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD. *Chest* 2004;125:71-76. PMID 14718423.
49. Vernooy JH, Möller GM, van Suylen RJ, van Spijk MP, Cloots RH, Hoet PH, Pennings HJ, Wouters EF. Increased granzyme A expression in type II pneumocytes of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 464–472. PMID 17138956.
50. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, *et ál.* Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 2001; 194:519-27. PMID 11514607.
51. Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, Ghilardi N, Lockhart C, Quinton LJ, Odden AR, *et ál.* Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med* 2005; 202:761-9. PMID 16157683.
52. McAllister F, Henry A, Kreindler JL, Dubin PJ, Ulrich L, Steele C, Finder JD, *et ál.* Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis. *J Immunol* 2005; 175:404-12. PMID 15972674.

53. Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK. Interleukin-17 in pulmonary host defense. *Exp Lung Res* 2007;33: 507-18. PMID 18075825.
54. O'Shaughnessy T, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8⁺ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:852-857. PMID 9117016.
55. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Ferraresso A, Drigo R, Potena A, Ciaccia A, *et ál.* Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:301-306. PMID 8430952.
56. Lams BE, Sousa AR, Rees PJ, Lee TH. Subepithelial immunopathology of large airways in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2000; 15:512–516. PMID 10759445.
57. Jeffery PK. Comparison of the structural and inflammatory features of COPD and asthma: Giles F. Filley Lecture. *Chest* 2000; 117:251s–260s. PMID 10843939.
58. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, *et ál.* Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1277–1285. PMID 9769292.
59. Balbi B, Bason C, Balleari E, Fiasella F, Pesci A, Ghio R, Fabiano F. Increased bronchoalveolar granulocytes and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during exacerbations of chronic bronchitis. *Eur Respir J* 1997; 10:846–850. PMID 9150323.
60. Zhu J, Qiu YS, Majumdar S, Gamble E, Matin D, Turato G, Fabbri LM, *et ál.* Bronchial eosinophilia and gene expression for IL-4, IL-5, and eosinophil chemoattractants in bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:109-116. PMID 11435248.
61. Panina-Bordignon P, D'Ambrosio D. Chemokines and their receptors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* 2003;9:104-110. PMID 12574689.
62. Strieter RM, Lukacs NW, Standiford TJ, Kunkel SL. Cytokines. 2. Cytokines and lung inflammation: mechanisms of neutrophil recruitment to the lung. *Thorax* 1993;48:765-769. PMID 8153928.
63. Noguera A, Busquets X, Sauleda J, Villaverde JM, MacNee W, Agustí AG. Expression of adhesion molecules and G proteins in circulating neutrophils in

- chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1664–8. PMID 9817722.
64. Torres JL, Ridker PM. Clinical use of high sensitivity C-reactive protein for the prediction of adverse cardiovascular events. *Curr Opin Cardiol* 2003;18: 471-8. PMID 14597888.
65. Garrod R, Marshall J, Barley E, Fredericks S, Hagan G: The relationship between inflammatory markers and disability in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Prim Care Respir J* 2007, 16(4):236-240. PMID 17665081.
66. Schols AM, Buurman WA, Staal van den Brekel AJ, Dentener MA, Wouters EF: Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1996, 51(8):819-824. PMID 8795671.
67. de Torres JP, Cordoba-Lanus E, Lopez-Aguilar C, Muros de Fuentes M, Montejo de Garcini A, Aguirre-Jaime A, *et ál.* C reactive protein levels and clinically important predictive outcomes in stable COPD patients. *Eur Respir J* 2006, 27(5):902-907. PMID 16455829.
68. Russell RE, Thorley A, Culpitt SV, Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, Fitzgerald M, *et ál.* Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283:867–873. PMID 12225964.
69. Carroll MC, Katzman P, Alicot EM, Koller BH, Geraghty DE, Orr HT, Strominger JL, *et ál.* Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 (23):8535-9. PMID 2825194.
70. Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J.* 2007; 48(1):11-23. PMID 17326240.
71. Festenstein H, Démant P. Inmunogenética fundamental, biología y aplicaciones clínicas de HLA y H-2. México, Editorial El manual moderno S. A.; 1981. pp. 127-139
72. Engelhard V. Presentación celular de los antígenos. *Investigación y Ciencia* 1994; 217:1-13
73. Fernando MM, Stevens CR, Walsh EC, De Jager PL, Goyette P, Plenge RM, Vyse TJ, *et ál.* Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS Genet.* 2008; 4(4):e1000024. PMID 18437207.

74. Página web del Instituto Anthony Nolan Trust:
<http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>. Consultada: 12/09/2009
75. Marsh SG; for the WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. Nomenclature for factors of the HLA system, update November 2010. *Tissue Antigens*. 2011;77(4):355-361. PMID 21388365.
76. Flaherty L. Major histocompatibility complex polymorphism: a non immune theory for selection. *Hum Immunol*. 1988;21(1):3-13. PMID 3284855.
77. Batchelor JR, McMichael AJ. Progress in understanding HLA and disease associations. *Br Med Bull*. 1987; 43(1):156-83. PMID 3315096.
78. Hirata AA, Terasaki PI. Cross-reactions between streptococcal M proteins and human transplantation antigens. *Science*;168(935):1095-6. PMID 4909764.
79. Lilly F. Mouse leukemia: a model of a multiple-gene disease. *J Natl Cancer Inst*. 1972;49(4):927-34. PMID 4343477.
80. Marsh DG, Meyers DA, Bias WB. The epidemiology and genetics of atopic allergy. *N Engl J Med*. 1981; 305(26):1551-9. PMID 6796882.
81. Harper JW, Elledge SJ. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*. 2007 14;28(5):739-45. PMID 18082599.
82. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009;461(7267):1071-8. PMID 19847258.
83. Panier S, Durocher D. Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair*. 2009;8(4):436-43. PMID 19230794
84. Carter S, Vousden KH. Modifications of p53: competing for the lysines. *Curr Opin Genet Dev*. 2009;19(1):18-24. PMID 19179064.
85. Méplan C, Richard MJ, Hainaut P. Redox signalling and transition metals in the control of the p53 pathway. *Biochem Pharmacol*. 2000;59(1):25-33. PMID: 10605931.
86. McDonnell JM, Fushman D, Milliman CL, Korsmeyer SJ, Cowburn D. Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell*. 1999;96(5):625-34: PMID 10089878.
87. Wang Y, Guan X, Fok KL, Li S, Zhang X, Miao S, Zong S, *et ál*. A novel member of the Rhomboid family, RHBDD1, regulates BIK-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(23):3822-9: PMID 18953687.
88. Li C, Li R, Grandis JR, Johnson DE. Bortezomib induces apoptosis via Bim and Bik up-regulation and synergizes with cisplatin in the killing of head and neck

squamous cell carcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(6):1647-55. PMID 18566236.

89. Gagnon KB, Delpire E. On the substrate recognition and negative regulation of SPAK, a kinase modulating Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport activity. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;299(3):C614-20. PMID 20463172.

90. Pinto-Plata VM, Mullerova H, Toso JF, Feudjo-Tepie M, Soriano JB, Vessey RS, Celli BR: C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and non-smokers. *Thorax* 2006, 61(1):23-28. PMID 16143583.

91. Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax* 2000; 55(2):114-120. PMID 10639527.

92. Song W, Zhao J, Li Z. Interleukin-6 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with COPD. *Chin Med J* 2001; 114:1140–1142. PMID 11729506.

93. Bucchioni E, Kharitonov SA, Allegra L, Barnes PJ. High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. *Respir Med* 2003;97: 1299-1302. PMID 14682411.

94. Wedzicha JA, Seemungal TA, MacCallum PK, Paul EA, Donaldson GC, Bhowmik A, Jeffries DJ *et ál.* Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease are accompanied by elevations of plasma fibrinogen and serum IL-6 levels. *Thromb Haemost* 2000; 84:210-215. PMID 10959691.

95. Debigare R, Marquis K, Cote CH, Tremblay RR, Michaud A, Leblanc P, Maltais F. *et ál.* Catabolic-anabolic balance and muscle wasting in patients with COPD. *Chest* 2003; 124:83-89. PMID 12853506.

96. Tanni SE, Pelegrino NR, Angeleli AY, Correa C, Godoy I. Smoking status and tumor necrosis factor-alpha mediated systemic inflammation in COPD patients. *J Inflamm.* 2010;7:29. PMID 20534161.

97. Rusznak C, Mills PR, Devalia JL, Sapsford RJ, Davies RJ, Lozewicz S. Effect of cigarette smoke on the permeability and IL-1 β and sICAM-1 release from cultured human bronchial epithelial cells of never-smokers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23:530–536. PMID 11017919.

98. Rupp J, Kothe H, Mueller A, Maass M, Dalhoff K. Imbalanced secretion of IL-1 β and IL-1RA in *Chlamydia pneumoniae*-infected mononuclear cells from COPD patients. *Eur Respir J* 2003; 22:274-279. PMID 12952260.

99. Takabatake N, Shibata Y, Abe S, Wada T, Machiya J, Igarashi A, Tokairin Y, *et ál.* A single nucleotide polymorphism in the CCL1 gene predicts acute exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 15; 174(8):875-85. PMID 16864713.
100. Shen M, Vermeulen R, Chapman RS, Berndt SI, He X, Chanock S, Caporaso N, Lan Q. A report of cytokine polymorphisms and COPD risk in Xuan Wei, China. *Int J Hyg Environ Health.* 2008;211(3-4):352-6. PMID: 17681858.
101. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153(2):530-4. PMID 8564092.
102. Yamamoto C, Yoneda T, Yoshikawa M, Fu A, Tokuyama T, Tsukaguchi K, Narita N. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest.* 1997;112(2):505-10. PMID 9266891.
103. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax.* 2004;59(7):574-80. PMID 15223864.
104. Kasuga I, Ruan J, Connett JE, Anthonisen NR, Sandford AJ. Lack of association of human leukocyte antigen-B7 with COPD and rate of decline in lung function. *Respir Med* 2005;99:1528-33. PMID 16291075.
105. Falfán-Valencia R, Camarena A, Juárez A, Becerril C, Montaña M, Cisneros J, Mendoza F, *et ál.* Major histocompatibility complex and alveolar epithelial apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Genet* 2005;118:235-44. PMID 16133177.
106. Aquino-Galvez A, Pérez-Rodríguez M, Camarena A, Falfan-Valencia R, Ruiz V, Montaña M, Barrera L *et ál.* MICA polymorphisms and decreased expression of the MICA receptor NKG2D contribute to idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility. *Hum Genet* 2009;125:639-48. PMID 19363685.
107. Camarena A, Juárez A, Mejía M, Estrada A, Carrillo G, Falfán R, Zuñiga J, *et ál.* Major histocompatibility complex and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in pigeon breeder's disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1528-33. PMID 11401868.
108. Choi JH, Lee KW, Kim CW, Park CS, Lee HY, Hur GY, Kim SH, *et ál.* The HLA DRB1*1501-DQB1*0602-DPB1*0501 haplotype is a risk factor for toluene

- diisocyanate-induced occupational asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;150:156-63. PMID 19439981.
109. Sugiyama Y, Kudoh S, Maeda H, Suzaki H, Takaku F. Analysis of HLA antigens in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141:1459-62. PMID 2350086.
110. Keicho N, Tokunaga K, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Bannai M, Emi M, *et ál.* Contribution of HLA genes to genetic predisposition in diffuse panbronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:846-50. PMID 9731015.
111. Park MH, Kim YW, Yoon HI, Yoo CG, Han SK, Shim YS, Kim WD. Association of HLA class I antigens with diffuse panbronchiolitis in Korean patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:526-9. PMID 9927368.
112. Kauffmann F, Kleisbauer JP, Cambon-De-Mouzon A, Mercier P, Constans J, Blanc M, Rouch Y, *et ál.* Genetic markers in chronic air-flow limitation. A genetic epidemiologic study. *Am Rev Respir Dis* 1983;127:263-9. PMID 6572487.
113. Canónico YC, Larocca NE, Moreno D, De Sanctis JB. HLA y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Revista de la Facultad de Medicina de Venezuela* 2008;31: 111-115.
114. Olerup O, Aldener A, Fogdell A, HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens.*; 1993;41(3):119-34. PMID 8316943.
115. Zetterquist H, Bengtsson M, Backstrom G, Egle-Jansson I, Ekdahl AM, Grunnet N, Gustafsson I, *et ál.* Report from the HLA class II typing by PCR-SSP Multicentre Study. *Eur J Immunogenet.* 1997;24(3):191-9. PMID 9226125.
116. Oudijk EJ, Lammers JW, Koenderman L. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl.* 2003;46:5-13. PMID 4621102.
117. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(7):3195-9. PMID 9096369.
118. Kieszko R, Krawczyk P, Chocholska S, Dmoszyńska A, Milanowski J. TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms in Polish patients with sarcoidosis. Connection with the susceptibility and prognosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2010;27(2):131-7. PMID 21319595.

119. Kumar V, Khosla R, Gupta V, Sarin BC, Sehajpal PK. Differential association of tumor necrosis factor-alpha single nucleotide polymorphism (-308) with tuberculosis and bronchial asthma. *Natl Med J India*. 2008;21(3):120-2. PMID 19004142.
120. Huang SL, Su CH, Chang SC. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(5):1436-9. PMID 9372657.
121. Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, Duff GW. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med*. 1993;177(2):557-60. PMID 8426126.
122. Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Dai J, Shapiro SD, *et ál*. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor-alpha release. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(8):1083-9. PMID 12522030.
123. Donaldson GC, Seemungal TA, Patel IS, Bhowmik A, Wilkinson TM, Hurst JR, MacCallum PK, *et ál*. Airway and systemic inflammation and decline in lung function in patients with COPD. 2005. *Chest*. 2009;136:e30. PMID 20162785.
124. Walston JD, Fallin MD, Cushman M, Lange L, Psaty B, Jenny N, Browner W, *et ál*. IL-6 gene variation is associated with IL-6 and C-reactive protein levels but not cardiovascular outcomes in the Cardiovascular Health Study. *Hum Genet* 2007;122(5):485-94. PMID 17851695.
125. Yende S, Waterer GW, Tolley EA, Newman AB, Bauer DC, Taaffe DR, Jensen R, *et ál*. Inflammatory markers are associated with ventilatory limitation and muscle dysfunction in obstructive lung disease in well functioning elderly subjects. *Thorax*. 2006;61(1):10-6. PMID 16284220.
126. Yende S, Tuomanen EI, Wunderink R, Kanaya A, Newman AB, Harris T, de Rekeneire N, *et ál*. Preinfection systemic inflammatory markers and risk of hospitalization due to pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(11):1440-6. PMID 16166617.
127. Kuhn C, Homer RJ, Zhu Z, Ward N, Flavell RA, Geba GP, Elias JA. Airway hyperresponsiveness and airway obstruction in transgenic mice. Morphologic correlates in mice overexpressing interleukin (IL)-11 and IL-6 in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;22(3):289-95. PMID 10696065.

128. Majello B, Arcone R, Toniatti C, Ciliberto G. Constitutive and IL-6-induced nuclear factors that interact with the human C-reactive protein promoter. *EMBO J*. 1990;9(2):457-65. PMID 2154372.
129. Aronson D, Roterman I, Yigla M, Kerner A, Avizohar O, Sella R, Bartha P, *et ál*. Inverse association between pulmonary function and C-reactive protein in apparently healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(6):626-32. PMID 16778162.
130. Shaaban R, Kony S, Driss F, Leynaert B, Soussan D, Pin I, Neukirch F, *et ál*. Change in C-reactive protein levels and FEV1 decline: a longitudinal population-based study. *Respir Med*. 2006;100(12):2112-20. PMID 16650972.
131. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*. 1998;102(7):1369-76. PMID 9769329.
132. Córdoba-Lanús E, de-Torres JP, López-Aguilar C, Rodríguez-Pérez MC, Maca-Meyer N, Montejo-de-Garcini A, Aguirre-Jaime A, *et ál*. Association of IL-6 gene polymorphisms and COPD in a Spanish population. *Respir Med*. 2008;102(12):1805-11: PMID 18693004.
133. Drost EM, MacNee W. Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF-alpha in the sequestration of neutrophils in the lung: effects on neutrophil deformability, adhesion receptor expression, and chemotaxis. *Eur J Immunol*. 2002;32(2):393-403. PMID 11813158.
134. Jeremy Hull, Hans Ackerman, Kate Isles, Stanley Usen, Margaret Pinder, Anne Thomson, Dominic Kwiatkowski. Unusual Haplotypic Structure of IL8, a Susceptibility Locus for a Common Respiratory Virus *Am J Hum Genet*. 2001; 69(2): 413-419: PMID 11431705.
135. de Diego Damiá A, Cortijo Gimeno J, Selma Ferrer MJ, León Fabregas M, Almudever Folch P, Milara Paya J. A study of the Effect of Proinflammatory Cytokines on the Epithelial Cells of Smokers, with or without COPD. *Arch Bronconeumol*. 2011. PMID 21676518.
136. Lenna S, Townsend DM, Tan FK, Kapanadze B, Markiewicz M, Trojanowska M. HLA-B35 upregulates endothelin-1 and downregulates endothelial nitric oxide synthase via endoplasmic reticulum stress response in endothelial cells. *J Immunol*. 2010 (9):4654-61. PMID 20335527.

137. Zhu X, Gadgil AS, Givelber R, George MP, Stoner MW, Scirba FC, Duncan SR. Peripheral T cell functions correlate with the severity of chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol.* 2009(5):3270-7.PMID 19234225.
138. Thammavongsa V, Schaefer M, Filzen T, Collins KL, Carrington M, Bangia N, Raghavan M. Assembly and intracellular trafficking of HLA-B*3501 and HLA-B*3503. *Immunogenetics.* 2009(11-12):703-16.PMID 19838694.

13.0 Anexos

13.1 Anexo 1. Hoja de interpretación para HLA-DRB1.



Fastype™ DR "Low Resolution" Typing Sheet

Kit Lot No. _____
Exp. Date _____

Positive Band (Default Size) Second Positive Band (Lower Band Size) WK Weak Amplification Partial Amplification ? Primer Sequence Unknown (See Specificity Table for details)

Serology Equivalents	Class II DRB Alleles Amplified	Primer Mix Number																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
DR1	*010101- *010203, *0104- *0111																									
DRB103	*0103																									
DR15 (2)	*150101- *1515																									
DR16 (2)	*160101- *1606																									
DR17 (3)	*030101- *030102, *0304, *0305, *0307, *0309, *0311- *0312, *0314- *0316, *0318- *0325, *0326 *030201- *0303																									
DR18 (3)	*0306, *0317, *0326, *0327 *0308 *0310 *0313																									
DR4	*040101- *0414, *0416- *0450 *0415																									
DR11	*110101- *110105, *1109- *1112, *1114, *1115, *1119, *1120, *1123, *1124, *1127- *1129, *1131- *1133, *1137, *1139, *1145, *1149, *1151 *1102- *110402, *1106, *1116, *1118, *1121, *1125, *1135, *1138, *1140, *1141, *1143, *1144, *1146- *1148, *1150 *1105, *1108, *1126, *1130, *1153 *1107 *1113, *1134, *1136, *1142 *1117, *1152 *1122																									
DR12	*120101- *120302, *1205- *1209 *1204																									
DR13	*130101- *1306, *1310- *1316, *1319, *1321- *1324, *1327, *1328, *1330- *1342, *1346- *1355, *1357- *1359, *1361- *1364 *1309, *1320, *1325, *1329, *1344, *1356 *1317 *1318 *1326, *1345 *1343																									
DR14	*140101, *140102, *1404, *140701, *140702, *1426, *1428, *1435, *1438, *1439 *1402, *1405, *1409, *1413, *1417, *1429, *1430, *1447 *140301, *140302, *1412 *140501, *1406, *1443, *1444, *1445 *140602, *1414, *1423, *1436, *1442 *1410 *1411 *1415 *1416, *1422 *1418 *1419- *1421, *1424, *1441 *1425 *1427 *1431- *1432 *1433 *1440 *1446, *1448																									
DR7	*070101- *0708																									
DR8	*080101- *080102, *080302, *0814, *0816, *0817, *0823, *0827 *080201- *080203, *0807, *0808, *0811, *0813, *0815, *0819 *080401- *080404, *0828 *0805, *0818 *0806, *0810, *0812, *0822 *0809, *0821 *0820 *0824																									
DR9	DRB1*080102- *0803																									
DR10	DRB1*100101- *100102																									
DR51	DRB3*010101- *0112, *0202- *0205 DRB3*0113																									
DR52	DRB3*010101- *0111, *0201- *0203, *0205- *0218, *030101- *0302 DRB3*0204, *0219, *0303 DRB3*0218																									
DR53	DRB4*010101, *0106 DRB4*0102- *0105, *0107 DRB4*0201N, *0301N																									
C.C	DRB1/DRB3/ DNA & Carry-over Contamination																									

En la primer columna se describe los equivalentes serológicos, la segunda columna corresponde a los alelos que puede identificar el sistema, las siguientes columnas (1-24) corresponden a las combinaciones de bandas alelo-específicas que se pueden obtener para extrapolar con el respectivo alelo.

13.2 Anexo 2. Hoja de interpretación para HLA-DQB1.



Fastype™ DQB1* High Resolution Typing Sheet

Positive Band (Default Size)
 Second Positive Band (Lower Band Size)
 WK Weak Amplification
 ^ Partial Amplification
 ? Primer Sequence Unknown (See Specificity Table for details)

Kit Lot No. _____

Exp. Date _____

-QH

DQB* Alleles Amplified		Primer Mix Number																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
D Q 6	*060101, *060103	+																								+
	*060102	+																								?
	*0602		+																							+
	*0603			+																						+
	*060401				+																					+
	*060402					+																				?
	*060501																									?
	*0606					?				?																?
	*0607				+																					?
	*0608					+																				?
	*0609																									+
	*0610, *061101, *061102																									?
	*0612																									?
	*0613																									?
	*0614																									?
	*0616																									?
	*0617																									?
	*0619, *0620																									?
*0621																									?	
D Q 3	*030101																								+	
	*030102																								?	
	*030201																								+	
	*030202																								?	
	*030302																								+	
	*030303																								?	
	*0304																								+	
	*030501																								+	
	*030502, *030503																								?	
	*0306																								?	
	*0307																								?	
	*0308																								?	
	*0309, *0310																								+	
*0311																								?		
*0312																								?		
*0313																								?		
DQ4	*0401																								+	
	*0402																								+	
D Q 5	*050101																								+	
	*050102																								?	
	*050201																								+	
	*050202																								?	
	*050301																								+	
	*050302																								?	
*0504																								+		
D Q 2	*0201																								+	
	*0202																								+	
	*0203																								?	

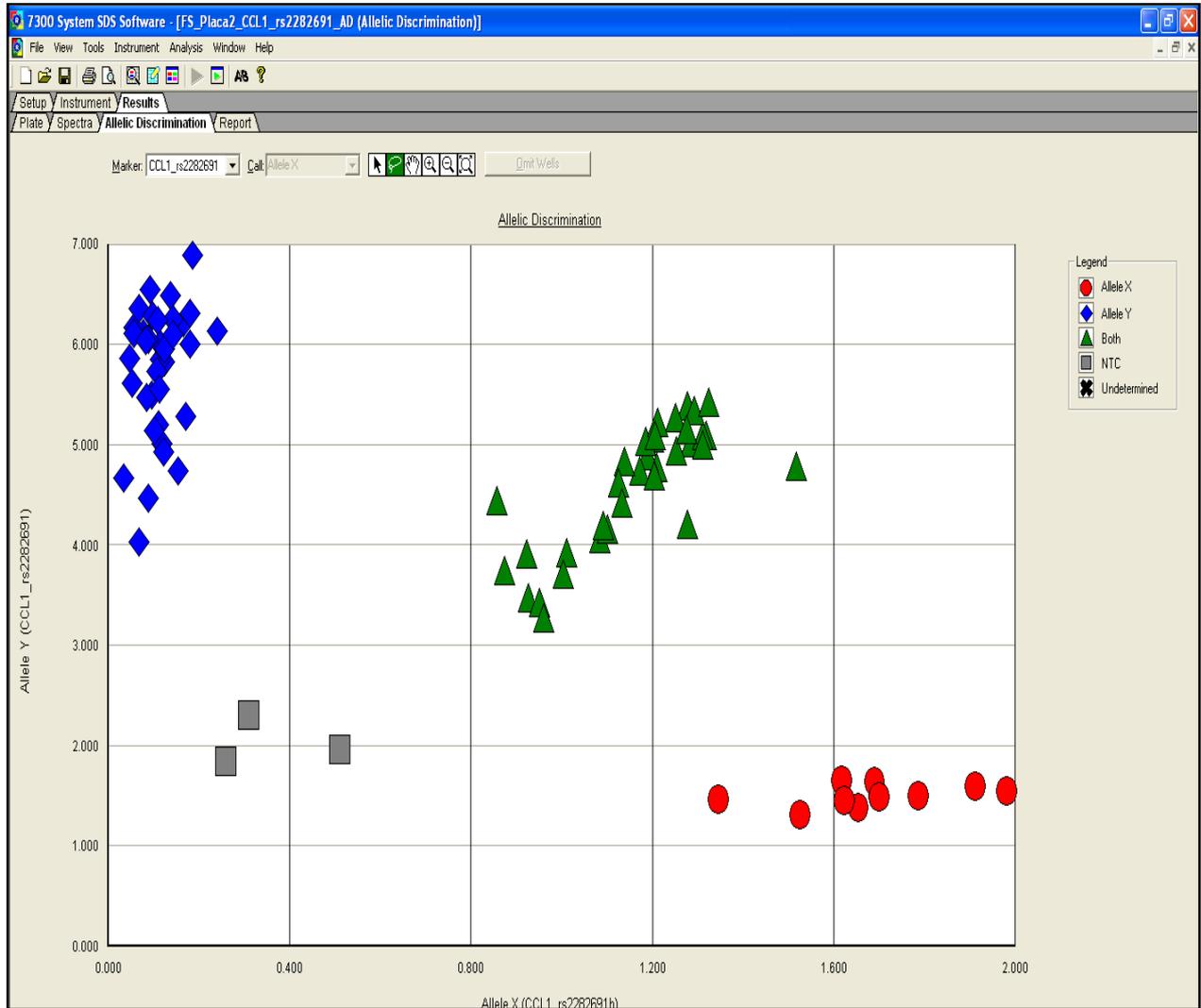
Reference: Nomenclatures are according to HLA alleles listed in the APRIL 2004 IMGT/HLA database Alignment (Marsh et al., "HLA Class I and II Sequence Alignments April 2004 Update") <http://www.ihc.org/ihc/data.html>

Revised 061504

FOR RESEARCH USE ONLY

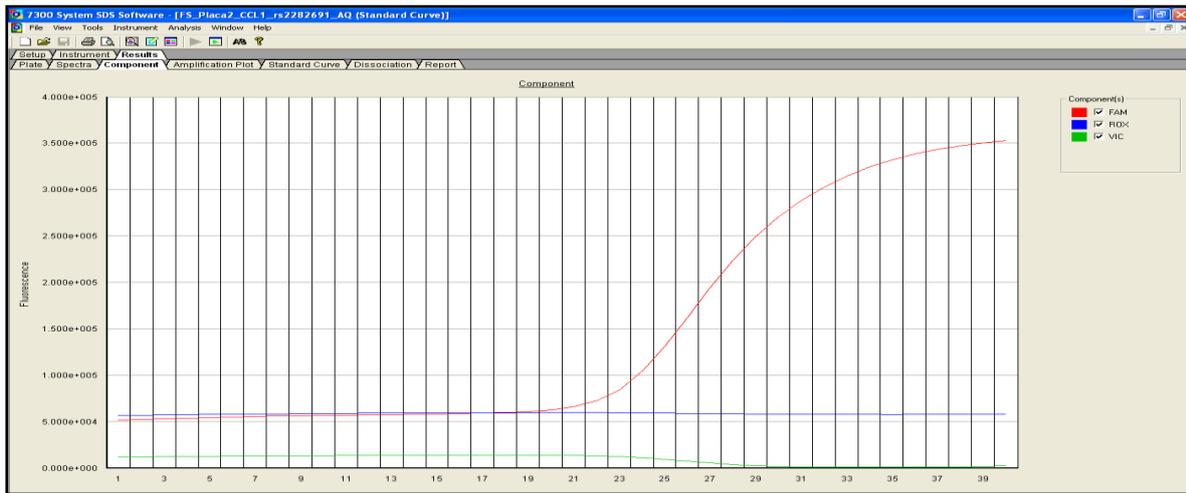
En la primer columna se describe los equivalentes serológicos, la segunda columna corresponde a los alelos que puede identificar el sistema, las siguientes columnas (1-24) corresponden a las combinaciones de bandas alelo-específicas que se pueden obtener para extrapolar con el respectivo alelo.

13.3 Anexo 3. Ploteo para discriminación alélica.



Ejemplo de un gráfico de discriminación alélica, los círculos representan el homocigoto para el alelo X (FAM), rombos el homocigoto para el alelo Y (VIC), los triángulos a los heterocigotos y cuadros a los NTC, las unidades utilizadas fueron: Unidades Relativas de Fluorescencia.

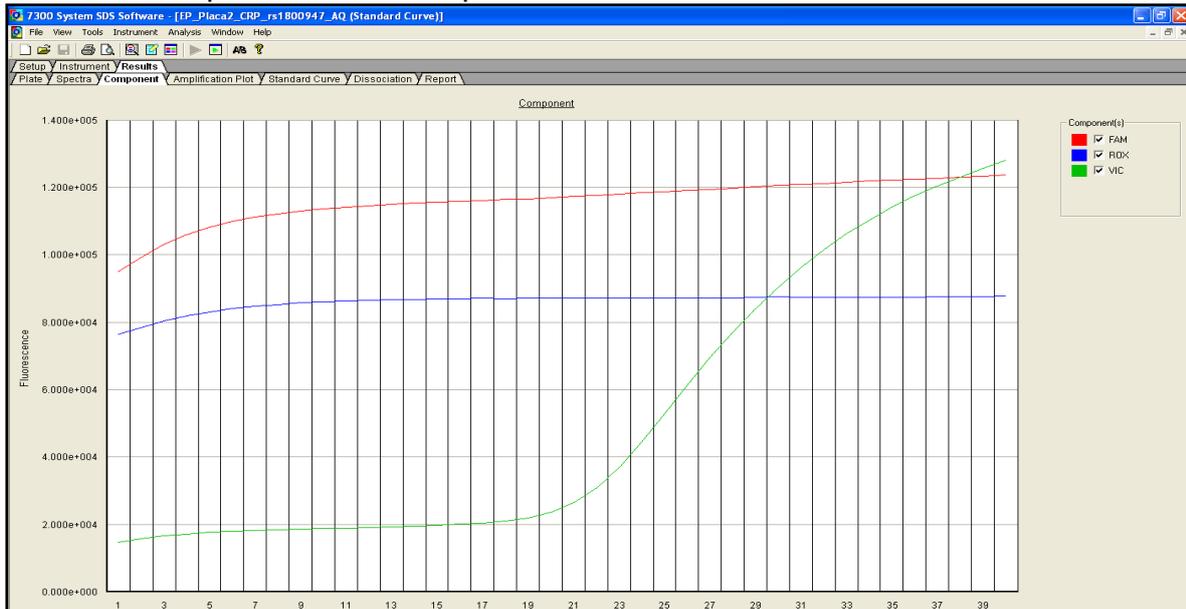
13.4 Anexo 4. Gráfico de amplificación en tiempo real.



Ejemplo de un gráfico de amplificación en tiempo real para un sujeto homocigoto para el alelo X, la línea roja representa el alelo X (FAM), la línea verde el alelo Y (VIC) y la línea azul la referencia pasiva (ROX), las unidades utilizadas fueron unidades relativas de fluorescencia.

13.5 Anexo 5.

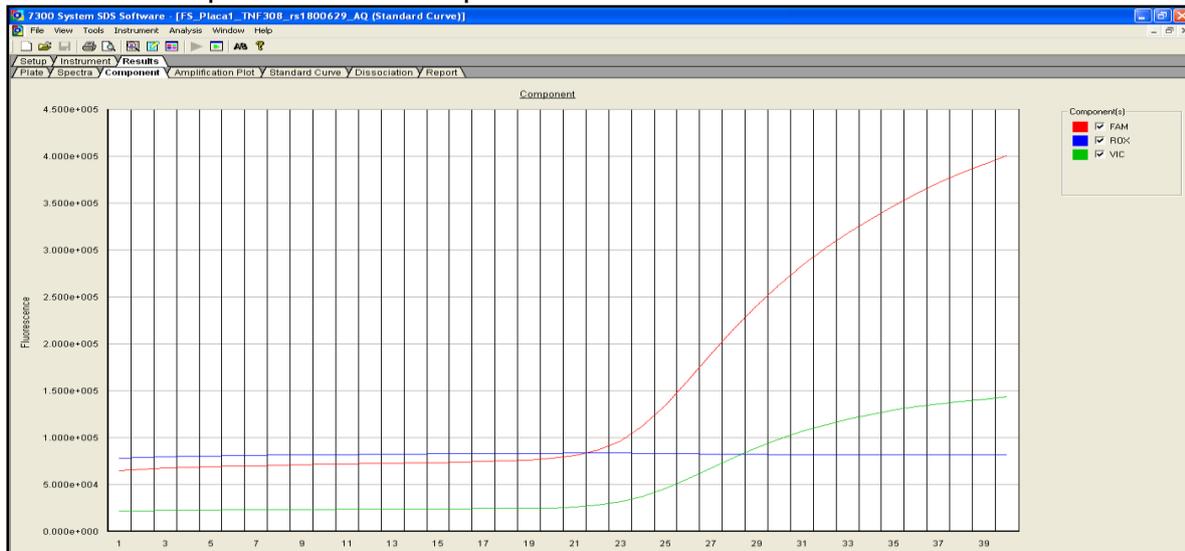
Gráfico de amplificación en tiempo real.



Ejemplo de un gráfico de amplificación en tiempo real para un sujeto homocigoto para el alelo X, la línea roja representa el alelo X (FAM), la línea verde el alelo Y (VIC) y la línea azul la referencia pasiva (ROX), las unidades utilizadas fueron unidades relativas de fluorescencia.

13.6 Anexo 6

Gráfico de amplificación en tiempo real.



Ejemplo de un gráfico de amplificación en tiempo real para un sujeto homocigoto para el alelo X, la línea roja representa el alelo X (FAM), la línea verde el alelo Y (VIC) y la línea azul la referencia pasiva (ROX), las unidades utilizadas fueron unidades relativas de fluorescencia.

13.7 Anexo. 7

Ejemplo de tabla de contingencia, en el cual se analizaron datos de del rs1800629 de TNF.

EpiInfo Versión 6			Statcalc		Noviembre 1993	
+ Enfermo -			Análisis de Tabla Simple			
			Odds ratio = 3.02 (1.23 <OR< 7.64)			
			Límites de Confianza de Cornfield (95%) para OR			
			Riesgo relativo = 2.75 (1.26 <RR< 6.00)			
			Límit. de Confianza (Serie de Taylor) 95% para RR			
			Ignora el R.R. es estudios de Caso-control.			
					Valor Chi	Valor-P
					<u> </u>	<u> </u>
			Sin corrección :		7.19	0.0073447 ←
			Mantel-Haenszel:		7.16	0.0074344 ←
			Corr. de Yates :		6.20	0.0127991 ←
			F2 más estratos;<Enter> No más estratos;F10 Salir			

Ejemplo de un tabla de contingencia de 2 x 2, en la primer fila se colocaron los sujetos con el genotipo en cuestión vs los individuos que tienen este genotipo del grupo de casos, en la segunda fila se colocaron de igual manera solo que para el grupo de control.