



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
E INVESTIGACIÓN**

**INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS
TRABAJADORES DEL ESTADO**

**POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEOTIDO COMO FACTOR
DE RIESGO PARA DEFICIENCIA DE INMUNOGLOBULINA E.
UN ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN QUE PRESENTA:

DR. JOSE AUGUSTO MALPICA CRUZ

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIDAD:

ALERGIA E INMUNOLOGIA CLINICA

ASESOR DE TESIS:

DR. JAVIER GOMEZ VERA

NO. DE REGISTRO DE PROTOCOLO:

244.2011

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. FÉLIX OCTAVIO MARTINEZ ALACALÁ
COORDINADOR DE CCAPADESI

DR. GUILBALDO PATIÑO CARRANZA.
JEFE DE ENSEÑANZA

DRA. MARTHA EUNICE RODRÍGUEZ ARELLANO
JEFE DE INVESTIGACIÓN

DR. JAVIER GOMEZ VERA
TITULAR DEL CURSO DE ALERGIA E INMUNOLOGIA CLINICA

DR. JAVIER GOMEZ VERA
ASESOR DE TESIS

DRA. SILVIA JIMENEZ MORALES
ASESOR DE TESIS

AGRADECIMIENTOS

Al instituto Nacional de Medicina Genómica en especial al laboratorio de inmunogenómica y enfermedades metabólicas donde se realizo el análisis molecular bajo la tutoría de la Dra. Silvia Jiménez Morales y a la Dra. Lorena Orozco Orozco Jefe del Laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su gran apoyo y cariño incondicional, ya que sin ellos nada hubiese sido posible.

A mis hermanos por siempre impulsarme a seguir adelante.

A ti Odette por todos los momentos juntos.

A mis maestros, por todas sus enseñanzas.

ÍNDICE

Resumen	6
Abstract	7
Antecedentes	8
Regulación molecular de la producción de IgE	9
IgE recombinación de clase de Switch	9
La desregulación inmune asociado con deficiencia de IgE	10
Genética de la inmunodeficiencia de IgE	10
importancia biológica de la ige	10
Prevención y control de la infección	10
Protección contra las enfermedades autoinmunes	11
Protección contra la enfermedad de las vías aéreas reactivas	12
Características clínicas	12
Tratamiento	12
Objetivo	13
Justificación	13
Material y métodos	13
Extracción de ADN a partir de sangre periférica	13
Cuantificación y evaluación de la integridad del ADN	14
Sondas TAQMAN	14
Resultados	15
Conclusiones	16
Bibliografía	17
Figuras	19
Tablas	20

RESUMEN

Antecedentes: Las inmunodeficiencias primarias (IDP) son enfermedades genéticas en las que uno o varios componentes del sistema inmune, incluyendo las células (es decir, las células B, células T, células asesinas naturales, los fagocitos, los componentes del complemento) o moléculas (citocinas, quimiocinas, etc) se ven afectados, dando lugar a una baja capacidad de eliminar los microorganismos y una alta susceptibilidad a enfermedades infecciosas. La mayoría de las IDP son entidades multifactoriales siendo el medio ambiente y múltiples factores genéticos implicados. Los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en el análisis de casos y controles ha ido aumentando el conocimiento de la etiopatogenia de varias enfermedades y la posibilidad de identificar marcadores moleculares útiles en el diagnóstico clínico.

Material y métodos: Se realizó un estudio de casos y controles incluyendo 19 pacientes con deficiencia de IgE (5 U / ml), 25 pacientes con dermatitis atópica con IgE y 180 controles sanos. 25 SNPs distribuidos en el IL-13, IL-10, IL-5, IL-4, FCER1B, INF γ , GM-CSF, STAT 3, 3 y TIK GATA-3 fueron analizados. La genotipificación se realizó con Sondas TaqMan. Se realizó equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y la significación estadística se evaluó mediante los programas de Finetti y STATCAL.

Resultados: Todos los genotipos, tanto en los casos y los controles estuvieron en HWE. Hemos documentado diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los SNP situados en IL-4 rs4986964, $p = 0,018$, OR = 14,74, IL-4R, rs18005010, $p = 0,018$, OR = 2.22, FCER-1B, rs556917, $p = 0,00001$, OR = 16,9, GM-CSF, STAT-3 y los genes GATA-3: GMFCS-130 ($p = 0.0000019$, OR = 0,22), STAT-3 rs2293152 ($p = 5,06 \times 10^{-9}$, OR = 6.18), GATA-3 rs2229360 ($p = 0,005$, OR = 13,52). La mayor diferencia se encontró en el alelo T de rs556917, que fue más frecuente en los casos en que los controles (42,1% y 1,5%, respectivamente, $p = 0,00001$ OR = 16.907, IC 95% 5,02 a 54,93,). Curiosamente, el alelo C de 4986964 (IL-4) aumentó significativamente en el genotipo homocigoto (C: OR = 14,74 IC 95% 2,38 a 91.234, $p = 0,018$ para CC OR= 29,4, IC95% 1,154 a 749,32, $p = 0,002$).

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que los SNPs se encuentra en los genes implicados en la producción de IgE son factor de riesgo genético de la inmunodeficiencia IgE. El aumento del tamaño de la muestra es en la actualidad para obtener conclusiones sólidas

ABSTRACT

Background: Primary immunodeficiencies (PID) are genetic diseases in which one or multiple components of the immune system, including cells (i.e. B cells, T cells, natural killer cells, phagocytes, complement components) or molecules (cytokines, chemokines, etc) are affected, leading to a low capacity to eliminate microorganisms and a high susceptibility to infection diseases. Most of the PID are multifactorial entities where the environmental and multiple genetic factor are involved. The single nucleotide polymorphisms (SNPs) analysis in case and control groups has been increasing the knowledge of the etiopathogenesis of several diseases and the opportunity to identify molecular markers useful in the clinical diagnosis.

Objective: To know whether SNPs in genes involved in the immune response are associated with IgE deficiency in Mexican population.

Material and methods: we performed a case control study including 19 pediatric patients with IgE deficiency (5 U/ml), and 180 healthy controls. 25 SNPs distributed in the *IL-13*, *IL-10*, *IL-5*, *IL4*, *FCER1B*, *INF γ* , *GM-CSF*, *STAT 3*, *GATA 3* and *TIK-2* were analyzed. Genotyping was performed using sondas TaqMan. Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) and statistical significance were evaluated using FINETTI and STATCAL software.

Results: All genotypes, both in cases and controls were in HWE. We documented statistically significant differences in the distribution of the SNPs located in *IL-4* rs4986964, $p=0.018$, OR= 14.74, *IL-4R*, rs18005010, $p=0.018$, OR= 2.22, *FCER-1B*, rs556917, $p=0.00001$, OR= 16.9, *GM-CSF*, *STAT-3* and *GATA-3* genes: *GMFCS-130* ($p=0.002$, OR= 0.54), *STAT-3* rs2293152 ($p=5.06 \times 10^{-9}$, OR= 6.18), *GATA-3* rs2229360 ($p=0.005$, OR= 13.52).

The highest difference was found in the T allele of rs556917, which was more frequent in cases than controls (42.1% and 1.5%, respectively, $p= 0.00001$ OR=16.907, CI 95% 5.02-54.93,). Interestingly, the C allele of rs1805010 (*IL-4*) increased significantly in homozygote genotype (C: OR= 14.74 CI95% 2.38-91.234, $p =0.018$ to CC OR= 29.4, CI95% 1.154-749.32, $p= 0.002$).

Conclusions: Our results suggest that SNPs located in the genes involved in the IgE production are risk genetic factor to IgE immunodeficiency. Increasing of the sample size is currently to get solid conclusions.

ANTECEDENTES

Las Inmunodeficiencias Primarias (IDP) son un conjunto de entidades que afectan al sistema inmunitario, comprometiendo a linfocitos T, B, fagocitos o proteínas del complemento. La incidencia de las IDP es variada; la deficiencia común selectiva de la IgA se presenta en 1:700 individuos sanos, la inmunodeficiencia común variable en 1:75.000 mientras que la inmunodeficiencia severa combinada se presenta en 1:100.000. Estos trastornos tienen una relación hombre:mujer de 5:1 en la infancia y de 1:1,4 en los adultos.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, las Inmunodeficiencias Primarias se clasifican en:

1. Deficiencias predominantemente de anticuerpos.
2. Inmunodeficiencias Combinadas
3. Otros síndromes de inmunodeficiencia bien definidos (Inmunodeficiencias asociadas a otros defectos mayores)
4. Defectos congénitos del número y/o función del fagocito
5. Deficiencias del Complemento
6. Deficiencias predominantemente del linfocito T
7. Inmunodeficiencia secundaria o asociada a otras enfermedades

Las deficiencias predominantemente de anticuerpos representan en su conjunto el 50% de las IDP. El descubrimiento de la IgE se atribuye a Johanson e Ishizaka, quienes al trabajar separadamente describieron en 1967 un nuevo isotipo del anticuerpo. Un mejor entendimiento de la inmunobiología de la IgE fue posible gracias a la descripción del fenómeno de cambio de clase (*switch*) por Susumu Tonegawa, quién en 1985 recibió el premio Nobel de Medicina por este descubrimiento.

En individuos normales, la concentración en suero de inmunoglobulina E (IgE) es de aproximadamente 100 ng/mL, 10^4 a 10^5 veces menor que la de IgG e IgA, por lo que es la inmunoglobulina menos abundante en el suero. La producción aberrante de IgE, a menudo resulta de la desregulación de la respuesta inmune Th2 y Th1, lo cual se asocia con numerosas enfermedades, incluyendo atopia, alergia, asma, eccema/dermatitis, infecciones parasitarias. Los niveles séricos de IgE también pueden ser modificados por la presencia de otras entidades incluyendo ataxia telangiectasia, síndrome de Bloom, de Nijmegen etc.

REGULACIÓN MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE IGE

La IgE es una clase de inmunoglobulina cuya función en las reacciones de hipersensibilidad inmediata y enfermedades alérgicas está bien establecida, sin embargo en la defensa contra patógenos no se conoce bien su participación.

La IgE consta de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas con regiones variables (V) y constantes (C). La cadena pesada ϵ consta de una cadena variable y cuatro dominios constantes ($C\epsilon$ 1-4). Cada dominio de Ig contiene alrededor de 110 aminoácidos. La IgE es un componente de la cascada de señalización que responde a la presencia de un alérgeno o antígeno. Dentro de esta vía de señalización se incluyen al Fc ϵ RI (receptor de alta afinidad de IgE), CD23 (también conocido como Fc ϵ RII), receptores de baja afinidad de IgE, y galactina 3, entre otros. La unión de la IgE frente al Fc ϵ RI de los mastocitos y basófilos induce una señalización que conduce a la degranulación de los mastocitos y la liberación de mediadores inflamatorios. Dentro de estos últimos, se incluyen a las proteasas, mediadores lipídicos y citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Estos mediadores son parcialmente responsables de la activación y supervivencia de los eosinófilos visto en muchos trastornos asociados con IgE elevada.

IgE recombinación de clase de Switch

Un proceso de dos pasos de la escisión y ligación del ADN son necesarios para la generación de una IgE funcional. En la respuesta primaria, caracterizada por la expresión de IgM de membrana e IgD, la recombinación de genes de cadena pesada (VDJ) y cadena ligera (VJ) se produce en el tejido fetal (hígado y médula ósea).

En la respuesta inmune secundaria, la formación de los isotipos IgG, IgA e IgE, switch de recombinación de clases (CSR) ocurre en tejidos linfoides secundarios (tejido linfático, bazo y las amígdalas) y es dependiente de antígenos y de la participación de células T. Lo anterior da lugar a anticuerpos de alta afinidad y la eficacia de la respuesta inmune humoral depende de la capacidad de las células B para el switch de IgM a otros isotipos. El repertorio de anticuerpos se forma no sólo por el switch, sino también por hipermutación somática (SHM) para crear anticuerpos con mayor afinidad.

Ambos procesos ocurren en los órganos linfoides secundarios. El cambio de clase a la IgE requiere dos señales: la primera está dada por la interleucina 4 (IL-4) e IL-13 y la segunda por la interacción de CD40 de las células B, con su ligando CD154 ligando (CD40L).

Está bien establecido que la IL-4 induce la producción de IgE, cuando las células B son estimuladas con IL-13. Varios factores, tales como el interferón- γ (IFN- γ), el IFN- α , factor de crecimiento transformante β e IL-10, prostaglandinas, se han identificado que antagonizan IL-4 que induce la producción de IgE en células B humanas y murinas.

LA DESREGULACIÓN INMUNE ASOCIADO CON DEFICIENCIA DE IGE

La deficiencia selectiva de IgE se define como la concentración menor a 5 UI/mL o la ausencia definitiva de IgE sérica sin otra anomalía inmunológica. Los pacientes no manifiestan signos. Se trata de un hallazgo de laboratorio que no equivale necesariamente a un trastorno clínico. La prevalencia de la deficiencia de IgE es altamente dependiente de la población en estudio. Pate y cols. midieron los niveles séricos de IgE en 500 donantes de sangre de la Cruz Roja (CR), 974 pacientes con alergia, 155 pacientes reumatológicos (RP) y encontraron que el 2,6%, 8,1% y 9,7%, respectivamente, tenían bajos niveles IgE. La deficiencia selectiva de IgE (<5U/dl) se observó en 0,8%, 3,1% y 1,3% respectivamente, mientras que una deficiencia mixta se detectó en el 1,8%, 5,0% y 8,4% de estas cohortes, respectivamente.

GENÉTICA DE LA INMUNODEFICIENCIA DE IGE

Las inmunodeficiencias primarias son un conjunto de entidades hereditarias que tienen un patrón de herencia monogénica y multifactorial. Las alteraciones en la producción de IgE generalmente se asocian a un origen multifactorial en la que se sugiere que polimorfismos en genes implicados en la respuesta inmune pueden ser factores de riesgo para su desarrollo. Por ejemplo, en un estudio de pares de hermanos, Mariah y col. demostraron que los polimorfismos en el cromosoma 5q31.1, donde están contenidos genes de un grupo importante de citocinas Th2, incluyendo IL-4, se asociaron con los niveles de IgE en suero.

Así, la mayor investigación de la genética de las inmunodeficiencias se ha dirigido al estudio de Hiper-IgE, inmunodeficiencias combinadas y aquellas que son parte de un síndrome. Sin embargo se desconoce los factores genéticos que pueden estar involucrados en el desarrollo de deficiencia de IgE.

IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LA IGE

Prevención y control de la infección

Varios reportes iniciales sugieren que las deficiencias aisladas de IgE predisponen a enfermedad crónica sinopulmonar. Ammann, *et al* en 1969 describieron la interesante función de la IgE en la defensa del huésped. En ese estudio se observó una mayor susceptibilidad de infecciones sinopulmonares en pacientes con ataxia telangiectasia relacionada con deficiencia combinada de IgA e IgE, no así en quienes tuvieron ataxia telangiectasia sólo con deficiencia de IgA. Por otro lado, en 1975 Buckley y cols. en 165 pacientes con inmunodeficiencia primaria, observaron que la concentración de IgE se encontraba significativamente disminuida, en comparación con el grupo control (pacientes sanos). En este momento, no existía una metodología estándar en uso para medir los niveles de IgE, ni los autores reportan el uso de una definición común que constituya una verdadera deficiencia de esta inmunoglobulina. Sin embargo, informes más recientes que utilizan tecnologías estandarizadas sugieren que anticuerpo IgE puede

desempeñar un papel protector en algunas infecciones parasitarias, bacterianas y virales en los seres humanos, y poseen propiedades anti-tumorales in vitro.

Secord y colaboradores reportaron que la incidencia de infecciones oportunistas y retraso del crecimiento fue menor en los niños con infección VIH-1 y niveles altos de IgE de lo que estaba en los niños infectados VIH-1 con niveles de IgE baja o normal y disminuciones similares en la cuenta de linfocitos T CD4+; anticuerpos IgE anti-VIH se detectó en el 43% de la niños con niveles altos de IgE. Pellegrino y asociados encontraron que todos los miembros de un grupo de sobrevivientes pediátricos que fueron infectados con VIH por vía materna, tenían niveles elevados de IgE sérica total e hicieron IgE anti HIV-1 capaces de inhibir la replicación del VIH in vitro. El efecto inhibitor se revirtió cuando la IgE se removió mediante columnas de inmunoafinidad o anticuerpos anti-IgE.

En un estudio con 700 pacientes asintomáticos de Tanzania y cols.,encontraron que la IgE de elevada (Pero no IgG) anti-*P. falciparum* se asocio con un menor riesgo para el desarrollo subsecuente de malaria clínicamente evidente. Duarte y cols. encontraron que respuestas de IgE específicas para *P. falciparum* han contribuido al control de la malaria, especialmente en pacientes asintomáticos. También hay informes de que los anticuerpos IgE pueden proporcionar inmunidad contra la infección por *B. burgdorferi* en los niños que dura toda la vida adulta, y contribuyen a la expulsión de parásitos intestinales como *N. americanus*. Los autores encontraron que la deficiencia de IgE predispone a la infección sinopulmonar por patógenos respiratorios comunes, incluyendo *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *M. catarrhalis*.

Protección contra las enfermedades autoinmunes

La prevalencia de la enfermedad autoinmune es elevado en personas con deficiencia de Inmnglobulinas particularmente con Hipogammaglobulinemia de IgA. Se ha documentado una predisposición similar en pacientes con deficiencia de IgE. Una serie de mecanismos que podrían explicar esta asociación: La IgE es una inmunoglobulina predominante de la mucosa, por lo tanto, es posible que la IgE proteja contra la autoinmunidad al impedir la absorción sistémica de los antígenos de la mucosa. La falta de la exclusión de antígeno en la barrera de la mucosa podría permitir que antígenos exógenos induzcan una respuestas autoinmunes por estimulación de los linfocitos autorreactivos a través de mimetismo molecular.

Con ello se promueve la formación de complejos inmunes; por activación policlonal de los linfocitos inducida por super-antígeno; mediante la inducción de una perturbación de la red de idiotipos, o por inducción aberrante de antígenos MHC de clase II.

Es También posible que factores genéticos comunes puedan predisponer a un individuo tanto para la deficiencia de IgE y enfermedades autoinmunes, o que los niveles bajos de IgE reflejan un desequilibrio entre la actividad de los linfocitos Th1 y Th2. Eso, a su vez, favorece el desarrollo de enfermedades autoinmunes mediadas por Th1 como el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide. El lupus eritematoso sistémico también puede estar relacionado con la disregulación de linfocitos Treg para auto-anticuerpos o defectos anti-apoptóticos.

Protección contra la enfermedad de las vías aéreas reactivas

La prevalencia de enfermedades reactivas de la vía aérea no alérgica (rinosinusitis, bronquitis y asma) aumentó en los pacientes con deficiencia de IgE. Sin embargo, no está claro si estos hallazgos fueron el resultado de una deficiencia de IgE o reflejo inherente del sesgo de selección. En un estudio en que participaron 664 mujeres embarazadas, Levin y cols., encontraron que los 21 individuos con niveles séricos bajos de IgE (<2,0UI / ml) tenían una mayor prevalencia de síntomas de rinosinusitis, pero una menor prevalencia de diagnóstico médico de rinosinusitis en comparación con los de niveles normales ó elevados de IgE. Otros estudios sobre la prevalencia de la enfermedad de la vía aérea en pacientes con deficiencia de IgE son del mismo modo no concluyentes. La evidencia experimental puede brindar una explicación de la ocurrencia de inflamación de la vía aérea de origen no-infeccioso, no alérgico en algunos pacientes con deficiencia de IgE. Kang y cols., demostraron la ocurrencia de la inflamación de las vías respiratorias en ratones con deficiencia de linfotoxina- α (LTA α -/-) junto con niveles disminuidos de IgE y la capacidad de respuesta de la vía aérea reducida, tanto a estímulos ambientales como a antígenos inducidos. Los autores de este artículo sugirieron que la presencia de niveles bajos de IgE reduce la capacidad de los mastocitos de responder normalmente a los antígenos de las vías respiratorias y, en consecuencia, para producir citocinas Th2 que favorecen desarrollo de (IL-4, IL-13).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La mayoría de los pacientes con deficiencia de IgE consultan con un médico por la persistencia de los síntomas sinopulmonares que con frecuencia se asumen como de origen alérgico. Estos pacientes son más propensos a quejarse de artralgias, fatiga crónica y síntomas sugestivos de infección de las vías respiratorias. Además, tienen una significativa mayor prevalencia de enfermedad autoinmune. En diferentes estudios con pacientes con deficiencia selectiva de IgE se encontró que tienen una mayor prevalencia de enfermedad sinopulmonar, fatiga crónica, y enfermedad autoinmune.

TRATAMIENTO

En la actualidad, los intentos de sustituir la IgE en personas con deficiencia de IgE no son viables ni recomendables pero se debe dar la terapia estándar para sus condiciones subyacentes. Se ha reportado que pacientes manejados con gammaglobulina intravenosa (400 mg/kg/mes), observan mejoría clínica, con espaciamento de las infecciones de las vías respiratorias y disminución en su gravedad.

OBJETIVOS

Objetivo general: Identificar Factores genéticos de riesgo para desarrollar deficiencia de Inmunoglobulina E

Objetivos específicos:

1. Determinar si existen SNPs en genes involucrados en la producción de IgE que se asocian a niveles bajos de IgE.

JUSTIFICACIÓN

La prevalencia de la deficiencia de IgE es altamente dependiente de la población en estudio. Los pacientes presentan diversidad en su fenotipo desde un curso asintomático hasta infecciones graves recurrentes.

Hasta el momento no se cuenta en nuestro país con estudios a nivel genético de esta inmunodeficiencia

MATERIAL Y MÉTODOS.

Se seleccionaron pacientes con diagnóstico de deficiencia de IgE, de la consulta externa del servicio de Alergia e Inmunología de la Clínica del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos del ISSSTE. El periodo de estudio fue de junio del 2010 al 01 junio de 2011. Teniendo como criterios de inclusión a pacientes con Inmunoglobulina E por debajo de 5UI/dl en 2 determinaciones realizadas en el laboratorio central del Hospital. Excluyéndose del estudio aquellos pacientes con otro tipo de inmunodeficiencias tanto celular como humoral. Se formaran 3 grupos, el grupo índice con deficiencia de IgE, el grupo control y un grupo con niveles de IgE elevada con Dermatitis Atópica. Se tomara muestra de sangre periférica en tubo con anticoagulante a los 3 grupos y se analizaran en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) mediante análisis de polimorfismos de un solo nucleótido a las muestras de los 3 grupos en búsqueda de polimorfismos.

Extracción de ADN a partir de sangre periférica

De cada participante se obtuvieron 5 a 10 ml de sangre periférica mediante venopunción. La muestra de sangre se almacenó en tubos Vacutainer con EDTA para evitar su coagulación. Las células nucleadas se obtuvieron a partir de la centrifugación de 5 ml de sangre total a 3,000 rpm durante 20 min. Posteriormente la interfase compuesta por leucocitos se transfirió a un tubo limpio y las células se lavaron con 6 ml de solución de lisis de eritrocitos (RCLB).

Para la extracción de ADN, se utilizaron alternativamente dos Kits, QIAGEN Blood (QIAGEN, GmbH D-40724, Hilden) y PUREGENE (GENTRA), bajo las especificaciones establecidas por los proveedores. Se adicionaron 3 ml de solución de lisis celular al tubo que contenía el botón de células blancas; se agitó vigorosamente en el vortex durante 1 min hasta eliminar los agregados celulares. Posteriormente, a este mismo tubo se le agregó 1 ml de solución

para precipitar proteínas, se agitó vigorosamente en el vortex durante 1 min y se centrifugó la muestra a 3,000 rpm durante 15 min.

El sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un tubo limpio, al cual se le agregó 5 ml de isopropanol para precipitar el ADN. Las hebras de ADN se hicieron evidentes después de que se agitó el tubo fue por inversión por lo menos 6 veces. Finalmente con una pipeta Pasteur se extrajo el ADN y se diluyó en 500 ul de buffer TE (TEKNOVA).

Cuantificación y evaluación de la integridad del ADN

La cuantificación del ADN se realizó en un espectrofotómetro (nanodrop) a una longitud de onda (λ) de 260 nm. El sistema arrojó la concentración en ng/ul, tomando en cuenta el valor de D0260 (densidad óptica a 260 nm) y la constante para ADN (0.05). Los índices de pureza y de proteínas también se determinaron automáticamente. Un valor mayor a 1.6 indicó un nivel de pureza del ADN adecuado para estudios posteriores.

La evaluación de integridad del ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. En el gel se cargó 1 ul de ADN con 5 ul de azul de bromofenol. La electroforesis se corrió a 100 volts durante 30 minutos y finalmente se observó en un transiluminador con luz UV. La integridad del ADN se consideró adecuada cuando su peso molecular fue mayor a 23,000 pares de bases (pb). (Fig 1)

Sondas TAQMAN

a) Diseño de oligonucleótidos y sondas específicas

Los oligonucleótidos para los análisis de secuenciación y las sondas de cada uno de los SNPs fueron diseñadas obteniendo la secuencia de cada gen del "Gene Bank" (NCBI) y utilizando los programas Primer Express 3.0 y File Builder v3.0 (Applied Biosystem Foster City, CA, USA), respectivamente.

b) Método fluorescente de 5' exonucleasa (TaqMan)

Para cada ensayo de discriminación alélica se diseñaron 2 sondas específicas marcadas en el extremo 5' con fluorocromos diferentes, VIC para el alelo 1 y FAM para el alelo 2. Además ambas sondas contenían en el extremo 3' un "quencher" (TAMRA) el cual mientras la sonda permanece intacta, inhibe la emisión de fluorescencia. Durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los primers hibridan con una secuencia específica del templado de ADN. Si éste contiene la secuencia polimórfica, la sonda TaqMan también hibrida con su secuencia homóloga.

Durante la PCR, la AmpliTaq Gold, que tiene actividad tanto de ADN polimerasa como de exonucleasa 5'-3', es capaz de digerir la sonda marcada durante la amplificación y liberar el colorante fluorescente de la acción del "quencher", de tal manera que dadas las condiciones de astringencia utilizadas durante la reacción, sólo la sonda específica para el polimorfismo presente es capaz de hibridar. Por lo tanto fue posible diferenciar un alelo del otro con base en el tipo de fluorescencia emitida. (Fig 2)

RESULTADOS

Características de los pacientes.

Se incluyeron 19 pacientes con deficiencia de IgE, 6 hombres y 13 mujeres, con una media de edad de 20 años. Entre las manifestaciones clínicas se encontraron infecciones de las vías respiratorias con sinusitis y faringitis en un 42%, y neumonía en un 15.7%. Del total de los pacientes incluidos un 26.3% estaban manejados con gammaglobulina intravenosa. Las características clínicas de los pacientes se resumen en la tabla 1.

Se realizaron perfil de inmunoglobulinas en todos los pacientes, Biometría hemática completa, subclases de IgG, pruebas cutáneas, rx de senos paranasales, rx de tórax, incluyéndose aquellos con niveles de IgE menor a 5UI/dl en por lo menos 2 cuantificaciones diferentes, sin ninguna alteración en el resto de inmunoglobulinas ó a nivel celular, con consentimiento firmado y donaron 10ml de sangre periférica, encontrando una elevada presencia de polimorfismos de IL-4, IL4-R, GM-CSF, STAT 3, GATA 3 en los pacientes con deficiencia de IgE comparados con los controles

Análisis de resultados.

Genotipos y frecuencias de alelos: El genotipo y la frecuencia de alelos en pacientes con deficiencia de IgE y controles se muestran en la tabla 2 Y 3. El análisis estadístico de sus resultados se realizó mediante los programas de bioestadística EPI INFO y FINETI.

El gen de **IL-4** en la posición 132009821 para el alelo C en los pacientes con deficiencia de IgE vs controles [p=0.018, OR= 14.74, C.I. (2.38-91.234)] y para el homocigotos del alelo C [p=0.002, OR= 29.400, C.I (1.154-749.32)], pero no para los pacientes con dermatitis atópica vs controles.

En el gen de **IL-4 R-50** en la posición 27319 existe diferencia significativa para el alelo A en los pacientes con deficiencia de IgE vs controles [p=0.018, OR= 2.22, C.I. (1.131-3.89)], para los homocigotos AA se aumenta [p=0.0017, OR= 6.5.7, C.I.(1.63-25.85)] y en pacientes con DA [p=0.03, OR= 0.497, C.I.(0.257-0.963)] y [p=0.007 OR= 5.41, C.I.(1.42-20.55)].

En el gen del **FCER1B** en la posición 59858712 existe diferencia significativa para el alelo A en los pacientes con deficiencia de IgE vs controles [p=0.00001, OR= 16.9, C.I. (5.02-54.93)], y en pacientes con DA [p=5.57 x10⁻¹⁰, OR= 26.10, C.I (8.86-76.9)].

Para el gen de **GM-CSF** en la posición 131436741 para el alelo A se encontró una diferencia significativa en los pacientes de deficiencia de IgE vs controles [p=0.0090, OR= 0.071 C.I. (0.0017-1.167)]

Para el gen de **GM-CSF** en la posición -130 para el alelo A se encontró una diferencia significativa en los pacientes de deficiencia de IgE vs controles [p=0.0054, OR= 0.060 C.I. (0.004-1.018)], no así en los pacientes con dermatitis atópica vs controles.

Para el gen de **STAT 3** en la posición40481529 se encontró diferencia significativa para los pacientes con deficiencia de IgE vs controles para ambos alelos C y G [p=5.06 X10⁻⁹, OR= 6.18

C.I. (3.34-13.88)], [p=1.48 X10⁻¹¹, OR= 63.500, C.I. (9.81-410)] respectivamente y en los pacientes con dermatitis atópica [p=0.00003, OR= 3.83, C.I. (1.98-7.14)], [p=0.00006, OR= 19.05, C.I.(2.84-127.55)].

Para el gen de **GATA 3** en la posición 8156085 el alelo C se encontró sobre expresado en pacientes con deficiencia de IgE vs controles [p=0.005, OR= 13.52, C.I. (2.90-62.97)].

Conclusiones

En este estudio se encontró asociación con la enfermedad en los polimorfismos para los siguientes genes: IL-4, IL-4 R50, FCER-1B, GM-CSF, STAT3, GATA3

Todos los genotipos, tanto en los casos y los controles estuvieron en HWE. Hemos documentado diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los SNPs situados en IL-4 rs4986964, p = 0,018, OR = 14,74, IL-4R, rs18005010, p = 0,018, OR = 2.22, FCER-1B, rs556917, p = 0,00001, OR = 16,9, GM-CSF, STAT-3 y los genes GATA-3: GMFCS-130 (p = 0.0000019, O = 0,22), STAT-3 rs2293152 (p = 5,06 X10⁻⁹, OR = 6.18), GATA-3 rs2229360 (p = 0,005, OR = 13,52).

La mayor diferencia se encontró en el alelo T de rs556917, que fue más frecuente en los casos en que los controles (42,1% y 1,5%, respectivamente, p = 0,00001 OR = 16.907, IC 95% 5,02 a 54,93,). Curiosamente, el alelo C de 4986964 (IL-4) aumentó significativamente en el genotipo homocigoto (C: OR = 14,74 IC 95% 2,38 a 91.234, p = 0,018 para CC OR= 29,4, IC95% 1,154 a 749,32, p = 0,002).

En los siguientes genes evaluados no se encontraron asociados para el riesgo de desarrollar deficiencia de IgE. **IL-13**: rs20541, rs1881457, rs1295685, **IL-10**, **IL-5**: Rs2069812 5' UTR, **FCER1B**: 59860178, rs556917, rs2847655, rs2583476, **INF γ**: rs1861494, STAT 3: rs2293152, rs9912773, **TIK-2** : rs280500, rs12720356, rs1269486, rs422628, rs1058240. Tabla 3

Nuestros resultados sugieren que existen polimorfismos que podrían estar relacionados con el aumento de la posibilidad de desarrollo de inmunodeficiencia selectiva de IgE, por lo que en caso de confirmarse esta asociación en estudios con un mayor número de pacientes, sería de utilidad el estudio genético temprano

BIBLIOGRAFIA

1. Oleastro Matías, Galicchio Miguel, Krazovec Silvia. Inmunodeficiencias primarias. Educación Médica Continua Pronaai 2001.
2. Susana García Pavón Osorio, José Jesús López Tiro, Javier Gómez Vera. Deficiencia de IgE ¿un padecimiento olvidado? Revista Alergia México 2009;56(6):192-7
3. Mariah B Pate¹, John Kelly Smith^{1,2}, David S Chi², Guha Krishnaswamy. Regulation and dysregulation of immunoglobulin E: a molecular and clinical perspective. Clinical and Molecular Allergy 2010, 8:3.
4. Ilio A, Strober W, Broder S, Polmar SH. The metabolism of IgE in patients with immunodeficiency states and neoplastic conditions. J Clin Invest 1977;59:743-55.
5. Donald Macglashan, Jr. IgE And Fc_γR1 Regulation. New York Academy Of Sciences. 2005 Doi: 10.1196/Annals.1313.009.
6. Polmar S, Waldmann TA, Balestra ST, Jost CM, Terry WD. Immunoglobulin E in immunologic deficiency diseases. J Clin Invest 1972;51:326-30.
7. Buckley RH, Fiscus SA. Serum IgD and IgE concentrations in immunodeficiency diseases. J Clin Invest 1975;55:157-65.
8. Schoettler JJ, Schleissner LA, Heiner DC. Familial IgE Deficiency associated with sinopulmonary disease. Chest 1989;96:516-21.
9. Dessein AJ, Parker WL, James SL, David JR. IgE antibody and resistance to infection. J Exp Med 1981;153:423-36.
10. Stiehm ER, Ochs HD, Winkelstein JA. Immunologic disorders in infants and children. 5th ed. Philadelphia: Saunders WB, 2004;pp:398-403.
11. Cain WA, Ammann AJ, Hong R, Ishizaka K. IgE deficiency associated with chronic sinopulmonary infection. J Clin Invest (Abstr)1969;48:12.
12. Smith JK, Krishnaswamy GH, Dykes R, Reynolds S, Berck SL. Clinical manifestations of IgE hypogammaglobulinemia. Ann Allergy Asthma Immunol 1997;78(3):313-8.
13. Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 20 May 1994: Vol. 264. no. 5162, pp. 1152 - 1156
14. D.P. Stites, K. Ishizaka and H. H. Fudenberg. Serum IgE concentrations in hypogammaglobulinemia and selective IgA deficiency studies on patients and family members. Clin. exp. Immunol. (1972) 10, 391-397.

15. Wen-Ju Tsai, Jeng-Yee Lin, Yao-Hsu Yang, Kyh-Hong Lee, Bor-Luen Chiang. Serum immunoglobulin E levels in patients with primary hypogammaglobulinemia – experience from a tertiary hospital in Taiwan. *J Microbiology Immunology Infectology*, 2009;42:271-275
16. Esra Ozcan, MD, Luigi D. Notarangelo, MD, and Raif S. Geha, MD. Primary immune deficiencies with aberrant IgE production. *J Allergy Clinical Immunology*; 2008;122:1054-62.
17. Stephen H. Polmar, Thomas A. Waldmann, Suellen T. Balestra, Margaret C. Jost, And William D. Terry. Immunoglobulin E In Immunologic Deficiency Diseases, Relation Of Ige And Iga To Respiratory Tract Disease In Isolated Ige Deficiency, Iga Deficiency, And Ataxia Telangiectasia. *The Journal of Clinical Investigation* 326-330
18. Sergio Roa,^{1, 2} Maria Isidoro-Garcia, Ignacio Davila, Elena Laffond, Felix Lorente, And Rogelio Gonzalez-Sarmiento. Molecular Analysis Of Activation-Induced Cytidine Deaminase Gene In Immunoglobulin-E Deficient Patients. *Clinical And Developmental Immunology*, Volume 2008.
19. Susan C. Fish, Debra D. Donaldson, Samuel J. Goldman, Cara M. M. Williams and Marion T. Kasaian. IgE Generation and Mast Cell Effector Function in Mice Deficient in IL-4 and IL-13. *J. Immunol.* 2005;174;7716-7724.
20. Angela C. Redrup, Brian P. Howard, Donald W. MacGlashan, Jr., Anne Kagey-Sobotka, Lawrence M. Lichtenstein and John, T. Schroeder, Differential Regulation of IL-4 and IL-13, Secretion by Human Basophils: Their Relationship to Histamine Release in Mixed Leukocyte Cultures. *J. Immunol.* 1998;160;1957-1964
21. Danielle T. Avery, Cindy S. Ma, Vanessa L. Bryant, Brigitte Santner-Nanan, Ralph Nanan, Melanie Wong, David A. Fulcher, Matthew C. Cook, and Stuart G. Tangye. STAT3 is required for IL-21–induced secretion of IgE from human naive B cells. *Blood.* 2008;112:1784-1793.

FIGURAS

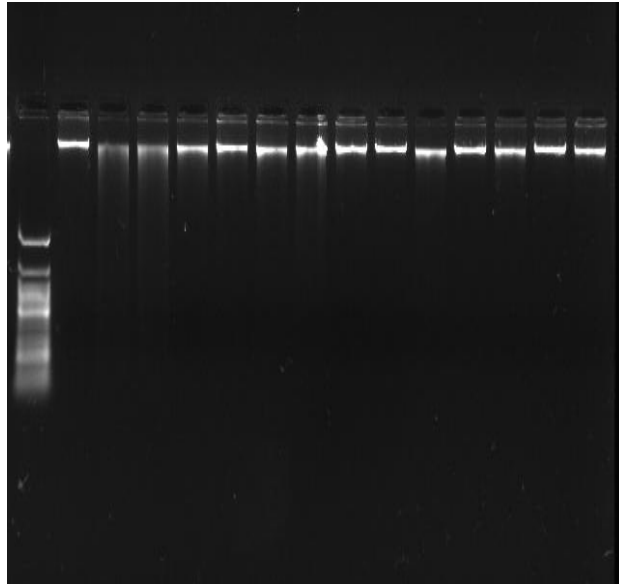


Fig. 1. Gel de agarosa al 2% para observar la integridad del DNA obtenido en el pozo numero 1 el marcador de peso

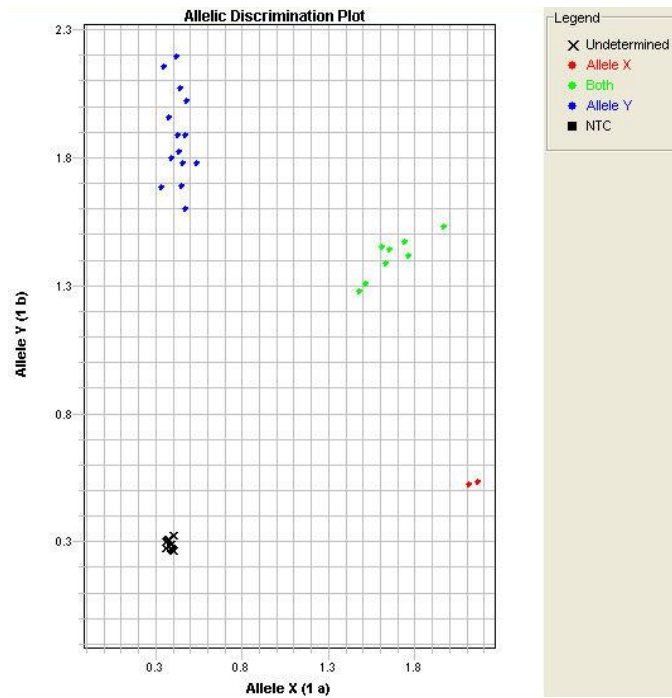


Fig. 2. Plot de discriminación alelica, en el eje de las X se observan los homocigotos para el cromosoma X, en el eje de las Y los homocigotos para el cromosoma Y los que quedan intermedios heterocigotos.

TABLAS

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes con deficiencia de IgE

Paciente	Sexo	Edad	IgE	Eosinófilos en sangre	Copropara citoscópicos (3)	Pruebas cutáneas *	Inmunoterapia	Gammaglobulina IV**	Rinitis alérgica	Urticaria	Dermatitis atópica	Asma	Sinusitis	Neumonía
1	M	7	3	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	F	52	4.9	179	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	M	34	4.6	500	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
4	F	11	3.9	100	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
5	M	4	4	105	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
6	F	47	4.2	0	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
7	M	34	4.6	200	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
8	F	42	4.3	100	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
9	M	14	4.3	100	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
10	F	7	1.6	100	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
11	F	4	4.5	200	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
12	M	14	4	100	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
13	M	4	4.5	300	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
14	F	5	3.8	100	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
15	F	4	4.2	100	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
16	F	1A6M	4.2	200	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
17	F	33	3.8	100	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
18	F	4	4.2	100	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
19	F	60	4.3	400	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-

*Pruebas cutáneas + se definió como roncha 3mm superior al control negativo. **Tratamiento con Gammaglobulina a 400mg/kg/dosis cada mes

Tabla 2. Relación de SNP's analizados, asociados para el desarrollo de deficiencia de IgE

GEN	rs	Posición en el Gen	Genotipos/alelos	Controles	IgE	DA	p	OR	95%CI
IL-4	4986964	132009821	C C	0 (0%)	1(5.2%)	0(0%)	0.0020.	29.400	1.154- 749.32
			C T	2 (1.1%)	1(5.2%)	1(4%)			
			T T	171 (98.9%)	17(89.6%)	24(96%)			
			C	2 (0.6%)	3(7.9%)	1(2%)	01849	14.743	2.38-91.234
			T	344 (99.4%)	35(92.1%)	49(98%)			
IL-4 R50	18005010	27319	AA	78 (44.8%)	5(26.3%)	6(30%)	0.003	6.500	1.634.25.85
			AG	84(48.3%)	9(47.3%)	9(45%)			
			GG	12(6.9%)	5(26.3%)	5(25%)			
			A	240 (69%)	19(50%)	21(52.5%)	0.018	2.22	1.131-4.366
			G	108 (31%)	19(50%)	19(47.5%)			
FCER1B	556917	59858712	A A	156 (96.9%)	11(57.9%)	12(50%)			
			A T	5 (3.1 %)	8(42.1%)	10(41.7%)	5.26 X10 ⁻¹⁰	22.69	6.34 -81.09
			T T	0 (0)	0(0%)	2(8.3%)			
			A	317 (98.5%)	30(78.9%)	34 (78.8%)			
			T	5(1.5%)	8(42.1%)	14(29.2%)	0.00001	16.907	5.20-54.93

GM-CSF	1469149	131436741	AA	123 (70.3%)	19(100%)	25(100%)	0.0054	0.060	0.004-1.018
			AC	50 (28.6%)	0(0%)	0(0%)			
			CC	2 (1.1%)	0(0%)	0(0%)			
			A	296 (84.6%)	38(100%)	50(100%)	0.00906	0.071	0.004-1.137
			C	54 (15.4%)	0%	0%			
GM-CSF		-130	AA	90 (52%)	3(15.8%)	3(12%)			
			AC	72 (41.6%)	8(42.1%)	11(44%)			
			CC	11 (6.4%)	8(42.1%)	11(44%)	0.0000019	21.82	4.31-124.99
			A	252(72.8%)	14(36.8%)	17(34%)			
			C	94(27.2%)	24(63.2%)	33(66%)	0.0000119	0.22	0.14-0.48
STAT 3	2293152	40481529	C C	127 (75.6%)	5(26.3%)	3(12%)	7.88x X10 ⁻¹⁰	8.67	2.45-25.54
			C G	39 (23.2%)	9(47.4%)	12(48%)			
			G G	2 (1.2%)	5(26.3%)	10(40%)			
			C	293 (87.2%)	19(50%)	18 (36)	5.06 X10 ⁻¹⁰	6.81	3.34-13.886
			G	43 (12.8%)	19(50%)	32(64%)			
GATA 3	2229360	8156085	C C	171(98.2%)	15(79%)	25(100%)	0.00002	15.200	3.10-74.33
			C T	3(1.8%)	4(21%)	0(0%)			
			TT	0(0%)	0(0%)	0(0%)			
			C	345(99.1%)	34(89.5%)	50 (100%)	0.0052	13.52	2.90-62.97
			T	3(0.9%)	4(10.5%)	0(0%)			

Tabla 3. Relación de SNP's analizados, no asociados para el desarrollo de deficiencia de IgE

GEN	rS	Posición en el Gen	Genotipos/alelos	Controles	IgE	DA	p
IL-13	20541	131995964	C C	65 (39.6%)	9(47.4%)	16(64%)	0.76
			C T	74 (45.2%)	8(42.1%)	6(24%)	
			T T	25 (15.2%)	2(10.5%)	3(12%)	
			C	204 (62.2%)	26(68.4%)	38(76%)	0.56
			T	124 (37.8)	12(31.6%)	12(24%)	
IL-13	1881457	131992409	AA	95 (52.8%)	11(57.9%)	11(44%)	0.54
			AC	75(41.7%)	6(31.6%)	9(36%)	
			CC	10 (5.5%)	2(10.5%)	5(20%)	
			A	265 (73.6%)	28(73.7%)	31(62%)	0.85
			C	95 (26.4%)	10(26.3%)	19(38%)	
IL-13	1295685	131996445	CC	23 (14.8%)	9(47.4%)	17(70.8%)	
			CT	57 (36.5%)	5(26.3%)	3(12.6%)	0.3
			TT	76 (48.7%)	5(26.3%)	4(16.6%)	
			C	103 (33%)	23(60.5%)	37(77.1%)	0.42
			T	209(77%)	15(39.5%)	11(22.91%)	
IL10		-819	CC	50 (30.1%)	6(31.6%)	7(28%)	0.78
			CT	78 (47%)	12(63.2%)	13(52%)	
			TT	38 (22.9%)	1(5.63%)	5(20%)	
			C	178(53.6%)	24(63.2%)	27(54%)	0.34
			T	154(46.4%)	14(36.8%)	23(46%)	
IL-5	2069812	131907815	C C	66 (40.7%)	8(44.4%)	14(56%)	0.45
			C T	83 (51.3%)	10(55.6%)	9(36%)	
			T T	13 (8%)	0(0%)	2(8%)	
			C	215 (66.4%)	26(72.3%)	37(74%)	0.60
			T	109 (33.6%)	10(27.3%)	13(26%)	

FCER1B	502581	59860178	A A	63 (35.6%)	11(57.9%)	14(56%)	0.12
			A C	103 (58.2%)	8(42.1%)	9(36%)	
			C C	11 (6.2%)	0 (0%)	2(8%)	
			A	229 (64.7%)	30(78.9%)	37 (74%)	0.11
			C	125 (35.3%)	8(21.1%)	13(26%)	
FCER1B	556917	59858712	A A	156 (96.9%)	11(57.9%)	12(50%)	
			A T	5 (3.1 %)	8(42.1%)	10(41.7%)	
			T T	0 (0)	0(0%)	2(8.3%)	
			A	317 (98.5%)	30(78.9%)	34 (78.8%)	
			T	5 (1.5%)	8(42.1%)	14(29.2%)	
FCER1B	2847655	59865671	C C	0	0(0%)	2(8.4%)	0.26
			C T	43 (27%)	8(42.1%)	4(16.6%)	
			T T	116 (73%)	11(57.9%)	18(75%)	
			C	43 (13.5%)	8(42.1%)	8(16.6%)	0.31
			T	275 (86.5%)	30(78.9%)	40(83.4%)	
FCER1B	2583476	59857581	C C	6 (3.5%)	0(0%)	2(8.3%)	0.68
			C T	64 (37.9%)	8(42.1%)	7(29.2%)	
			T T	99 (58.6%)	11(57.9%)	15(62.5%)	
			C	76 (22.5%)	8(42.1%)	11(22.9%)	0.99
			T	262 (77.5%)	30(78.9%)	37(77.1%)	
INF γ	1861494	40481529	C C	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)	0.16
			C T	1 (0.5%)	0(0%)	0(0%)	
			T T	179 (99.5%)	19(100%)	25(100%)	
			C	1 (0.3%)	0(0%)	0 (0%)	0.16
			T	359 (99.7%)	38(100%)	50(100%)	
STAT 3	8074524	40469598	C C	149 (86.7%)	16(84.2%)	22(88%)	0.74
			C T	20 (11.6%)	3(15.8%)	3(12%)	
			T T	3 (1.7%)	0(0%)	0(0%)	
			C	318 (92.5%)	35(92.1%)	47(94%)	0.85

			T	26 (7.5%)	3(7.9%)	3(6%)	
STAT 3	9912773	40510534	C C	127 (75.6%)	10(52.6%)	17(68%)	0.69
			C G	39 (23.2%)	9(47.4%)	8(32%)	
			G G	2 (1.2%)	0(0%)	0(0%)	
			C	293 (87.2%)	29(6.3%)	42(84%)	0.11
			G	43 (12.8%)	9(23.7%)	8(16%)	
TIK-2	280500	46065244	A A	154(90.1%)	15(79%)	19(76%)	0.57
			A G	17(9.9%)	4(21%)	6(24%)	
			G G	0(0%)	0(0%)	0(0%)	
			A	325(95.1%)	34(89.5%)	44(88%)	0.14
			G	17(4.9%)	4(10.5%)	6(12%)	
TIK-2	12720356	10490402	G G	167(97.6)	18(94.8%)	25(100)	0.45
			G T	4(2.4)	1(5.2%)	0(0%)	
			T T	0(0%)	0(0%)	0(0%)	
			G	338(98.8%)	37(97.4%)	50(100%)	1
			T	4(1.2%)	1(2.6%)	0	
GATA 3	11567879	8135735	A A	168(96.6%)	19(100%)	25(0%)	0.41
			A G	6(3.4%)	0(0%)	0(0%)	
			G G	0(0%)	0(0)	0(0)	
			A	342(98.3%)	38(100%)	50(100%)	2.42
			G	6(1.7%)	0(0%)	0(0)	
GATA 3	1269486	8136205	A A	0(0%)	0(0%)	1(4%)	0.93
			A G	29(16.6)	3(15.8%)	3(12%)	
			G G	145(83.4)	16(84.2%)	21(84%)	
			A	29(8.3%)	3(7.9%)	5(10%)	1
			G	319(91.7%)	35(92.1%)	45(90%)	