



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**SECUENCIACIÓN DE REGIONES PROMOTORAS DE *TNF*, *IL6*, E *IL8*, SU
CORRELACIÓN CON LOS NIVELES DE EXPRESIÓN Y GRAVEDAD CLÍNICA DE
ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC) SECUNDARIA A
TABAQUISMO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

RESÉNDIZ HERNÁNDEZ JUAN MANUEL

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RAMCÉS FALFÁN VALENCIA
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS
COMITÉ TUTOR: DRA. LAURA COLIN BARENQUE
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ

MÉXICO, CD.MX. MAYO, 2016.



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 el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 15 de febrero de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno **RESÉNDIZ HERNÁNDEZ JUAN MANUEL** con número de cuenta 510007915 con la tesis titulada "SECUENCIACIÓN DE REGIONES PROMOTORAS DE TNF, IL6, E IL8, SU CORRELACIÓN CON LOS NIVELES DE EXPRESIÓN Y GRAVEDAD CLÍNICA DE ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC) SECUNDARIA A TABAQUISMO", realizada bajo la dirección del DR. RAMCÉS FALFÁN VALENCIA:

Presidente: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
Vocal: DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL
Secretario: DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN
Suplente: DR. DAVID CRUZ ROBLES
Suplente: DRA. LAURA COLIN BARENQUE

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 26 de abril de 2016

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por darme la oportunidad de formarme como Doctor en Ciencias, con las máximas exigencias y calidad académica.

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

Al Dr. en C. Ramcés Falfán-Valencia, porque como mi tutor principal, su dirección y disciplina lograron la conclusión de este trabajo.

A la Dra. Laura Colin Barenque y Dr. Gilberto Vargas Alarcón, que fungieron como comité tutor, y sus exigencias y aportaciones incentivaron mi crecimiento académico-profesional.

Índice

Lista de figuras	i
Lista de tablas	i
1.0 Resumen	1
2.0 Abstract	3
3.0 Introducción	5
3.1 Definición de EPOC.....	5
3.2 Epidemiología.....	5
3.3 Patogénesis.....	6
3.3.1 Obstrucción de las vías aéreas de pequeño calibre.....	7
3.3.2 Destrucción alveolar.....	7
3.4 Mecanismos moleculares.....	8
3.5 Hipótesis de iniciación de la EPOC.....	9
3.5.1 Sistema de proteasas/antiproteasas.....	10
3.5.1.1 Deficiencia de AAT.....	10
3.5.1.2 Herencia y polimorfismo del gen <i>SERPINA1</i>	11
3.5.1.3 Subtipos PiM.....	12
3.5.1.4 Otros inhibidores de proteasas.....	13
3.5.2 Sistema oxidantes/antioxidantes.....	14
3.6 Inflamación.....	15
3.6.1 Mediadores químicos de la inflamación.....	16
3.6.1.1 Citocinas.....	16
3.6.1.1.1 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α).....	17
3.6.1.1.1.1 Estructura proteica.....	17
3.6.1.1.1.2 Estructura génica y regulación de la expresión.....	18
3.6.1.1.1.3 Función biológica.....	20
3.6.1.1.2 Interleucina 6 (IL-6).....	21
3.6.1.1.2.1 Estructura Proteica.....	21
3.6.1.1.2.2 Estructura génica y regulación de la expresión.....	22
3.6.1.1.2.3 Función biológica.....	24
3.6.1.1.3 Interleucina 8 (CXCL8).....	25
3.6.1.1.3.1 La familia de las quimiocinas.....	25
3.6.1.1.3.2 Estructura proteica de CXCL8.....	26
3.6.1.1.3.3 Estructura génica y regulación de la expresión de CXCL8.....	27
3.6.1.1.3.4 Función biológica de CXCL8.....	28
3.7 Inflamación en EPOC.....	29
3.8 Inflamación pulmonar.....	29
4.0 Antecedentes	30
5.0 Hipótesis	34
6.0 Objetivo General	34
6.1 Objetivos Particulares	34
7.0 Diseño del estudio	35
7.1 Selección de participantes.....	35
7.2 Etapas.....	36
7.3 Definición de caso y control.....	36
7.4 Criterios de inclusión, no inclusión y eliminación.....	36
7.4.1 Criterios de inclusión:.....	36
7.4.2 Criterios de no inclusión:.....	37
7.4.3 Criterios de eliminación:.....	37
8.0 Metodología	38
8.1 Obtención de DNA genómico.....	38
8.2 Selección y diseño de regiones a secuenciar.....	38
8.3 Secuenciación bidireccional.....	39
8.4 Alineación de secuencias.....	40
8.5 Discriminación alélica para genotipificación de SNP.....	40
8.6 Inducción de esputo.....	41
8.7 Expresión de mRNA por sondas Taqman.....	42
8.8 Análisis Estadístico.....	42
9.0 Resultados	44
9.1 Población de estudio.....	44
9.2 Primera etapa.....	46
9.2.1 Conjuntos de alineación en <i>TNF</i>	46
9.2.2 Estratificación por grado GOLD de <i>contigs</i> de <i>TNF</i>	46
9.2.3 Determinación de SNP en <i>TNF</i> por secuenciación.....	47
9.2.4 Conjuntos de alineación en <i>IL6</i>	49
9.2.5 Estratificación por grado GOLD de <i>contigs</i> de <i>IL6</i>	49
9.2.6 Determinación de SNP en <i>IL6</i> por secuenciación.....	50
9.2.7 Conjuntos de alineación en <i>IL8</i>	52
9.3 Segunda etapa.....	52
9.3.1 Frecuencias de genotipos en <i>TNF</i>	52
9.3.2 Frecuencias de genotipos en <i>IL6</i>	52
9.3.3 Análisis de haplotipos.....	53
9.4 Determinación de la expresión de mRNA de TNF- α e IL-6.....	55
9.4.1 Expresión de mRNA de TNF- α	55
9.4.2 Expresión de mRNA de IL-6.....	55
10.0 Discusión	58
11. Conclusiones	64
12.0 Literatura citada	65
Anexo 1 Artículo de requisito	78
Anexo 2 Secuencias	86

Lista de figuras

	Página
Figura 1 Mecanismos moleculares de daño en EPOC	9
Figura 2 Sitios de unión de los principales factores de transcripción de <i>TNF</i>	19
Figura 3 Sitios de unión de los principales factores de transcripción de <i>IL6</i>	24
Figura 4 Sitios de unión de los principales factores de transcripción de <i>IL8</i>	28
Figura 5 Haplotipos en <i>TNF</i>	54
Figura 6 Haplotipos en <i>IL6</i>	55
Figura 7 Expresión de <i>TNF-α</i>	57

Lista de tablas

	Página
Tabla 1 Clasificación espirométrica de la gravedad de EPOC	5
Tabla 2 Principales antecedentes en EPOC	
Tabla 3 Secuencias de los iniciadores utilizados	39
Tabla 4 Ciclos y temperaturas de PCR en tiempo real para los genes incluidos	40
Tabla 5 Componentes de la reacción de PCR en tiempo real para genotipificación para los genes incluidos	41
Tabla 6 Componentes de reacción de qPCR	42
Tabla 7 Datos demográficos de población incluida	45
Tabla 8 Frecuencias de <i>contigs</i> de <i>TNF</i>	46
Tabla 9 Frecuencias de <i>contigs</i> en <i>TNF</i> en estratificación por grado GOLD	47
Tabla 10 Frecuencias de genotipos encontradas en <i>TNF</i> por secuenciación en la primera etapa (PE) y discriminación alélica en la segunda etapa (SE)	48
Tabla 11 Frecuencias de <i>contigs</i> de <i>IL6</i>	49
Tabla 12 Frecuencias de <i>contigs</i> en <i>IL6</i> en estratificación por grado GOLD	50
Tabla 13 Frecuencias de genotipos encontradas en <i>IL6</i> por secuenciación en la primera etapa (PE) y discriminación alélica en la segunda etapa (SE)	51
Tabla 14 Frecuencias de <i>contigs</i> de <i>IL8</i>	52
Tabla15 Equilibrio de Hardy-Wienberg en SNP de <i>TNF</i> e <i>IL6</i>	54

1.0 Resumen

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica es una enfermedad inflamatoria en respuesta a partículas o gases nocivos, se han reportado asociaciones de polimorfismos genéticos en *TNF*, *IL6* e *IL8*, en asiáticos y caucásicos, no así en poblaciones mestizas. Métodos: Estudio de casos-contróles, en 2 etapas; en la primera se incluyeron pacientes con EPOC (EPT, n=165) y fumadores sin la enfermedad (FSE, n=165), se determinó la secuencia del promotor de *TNF*, *IL6* e *IL8* empleando secuenciación directa; en la segunda etapa los polimorfismos identificados se validaron por PCR en tiempo real (EPT=260 y FSE=506); adicionalmente se determinó la expresión de mRNA por qPCR en células pulmonares y de sangre periférica. Resultados: En la primera etapa se determinaron 11 diferentes conjuntos de alineación “contigs” en *TNF*, de los cuales el contig 10 se encontró asociado a susceptibilidad ($p=5.0E-04$, OR=3.64, IC95%=2.03-6.71) y el 1 con mayor grado GOLD ($p=1.0E-02$, OR=3.82, IC95%=1.30-10.33). En *IL6* se encontraron 8 contigs diferentes, de los cuales el 3 se encuentra asociado tanto con susceptibilidad ($p=1.9E-02$, OR=2.39 IC95%=1.14-5.23) como con gravedad clínica ($p=1.7E-05$, OR=3.82, 95% CI=1.99-7.43). Los SNP contenidos en estas regiones se identificaron individualmente, para *TNF* el genotipo GA de los rs1800629 ($p=3.8E-02$, OR=2.07 IC95%=1.04-4.25), rs56036015 ($p=8.2E-03$, OR=3.18 IC95%=1.32-8.46) y rs361525 ($p=1.0E-02$, OR=4.220 IC95%=1.71-11.84) se mostraron incrementados en el grupo EPT vs FSE; al realizar la validación en la segunda etapa, el hallazgo se mantuvo con los rs1800629 ($6.00E-03$, OR=2.26, IC95%=1.23-4.15) y rs56036015 ($p=1.10E-03$, OR=2.54, IC95%=1.40-4.61). Para *IL6*, el genotipo GC del rs140838807 ($p=2.0E-02$, OR=1.85, IC 95%=1.09-3.16) y GA del rs1800797 ($p=2.7E-02$, OR=0.60, IC 95%=0.38-0.95) mostraron asociación, sin embargo, en la validación no se conservó dicha asociación. La expresión de TNF- α fue mayor en el grupo de pacientes en relación a los fumadores sin

la enfermedad. Conclusión: Existen variantes genéticas en el promotor de *TNF* que se asocian con riesgo incrementado a EPOC secundaria a tabaquismo, así como con mayor grado GOLD en población mestiza-mexicana.

Palabras claves: EPOC; *TNF*; *IL6*, *IL8*, SNP; GOLD; población mestiza-mexicana.

2.0 Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease is an inflammatory disease in response to noxious particles or gases, there are reported of association of genetic polymorphisms *TNF*, *IL6* and *IL8* in Asians and Caucasians, but not in mixed populations. Methods: A case-control study in 2 stages was conducted; in the first COPD patients (EPT, n=165) and smokers without the disease (FSE, n=165) were included, the promoter sequence of 3 genes were determined using direct sequencing; in the second stage the identified polymorphisms were validated by real-time PCR (EPT=260 and FSE=506); additionally, mRNA expression was determined by qPCR in lung and peripheral blood cells. In the first step was determined 11 different *TNF* contigs, of which contig 10 found associated with susceptibility ($p=5.0E-04$, OR=3.64, 95% CI=2.03-6.71) and contig 10 with more grade GOLD ($p=1.0E-02$, OR=3.82, 95% CI=1.30-10.33). 8 contigs were found in *IL6*, of which contig 3 is associated both with susceptibility ($p=1.9E-02$, OR=2.39 95% CI=1.14-5.23) and with clinical severity ($p=1.7E-05$, OR=3.82, 95% CI=1.99-7.43). The SNP contained in these regions GA genotype of rs1800629 ($p=3.8E-02$, OR=2.07 95% CI=1.04-4.25), rs56036015 were individually identified, for *TNF* ($p=8.2E-03$, OR=3.18, 95 % CI=1.32-8.46) and rs361525 ($p=1.0E-02$, OR=4.220 95% CI=1.71-11.84) were increased in the COPD group vs SWD; to perform validation in the second stage, the finding remained at rs1800629 ($p=6.00E-03$, OR=2.26, 95% CI=1.23-4.15) and rs56036015 ($p=1.10E-03$, OR=2.54, 95% CI=1.40-4.61). For *IL6*, the rs140838807 GC genotype ($p=2.0E-02$, OR=1.85, 95% CI=1.09-3.16) and GA of rs1800797 ($p=2.7E-02$, OR=0.60, 95% CI=0.38- 0.95) showed association, however, in validating the association cannot keep. The $TNF-\alpha$ expression was increased in the patient group

compared to smokers without the disease. Conclusion: There are genetic variants in the *TNF* promoter associated with increased risk for COPD secondary to smoking as well as greater GOLD in Mestizo-Mexican population.

Key Words: COPD; *TNF*; *IL6*, *IL8*, SNP; GOLD; Mexican-mestizo population.

3.0 Introducción

3.1 Definición de EPOC

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se define por la Iniciativa Global para la EPOC (GOLD, por sus siglas en inglés), en su actualización de enero de 2014, como una enfermedad común, prevenible y tratable, caracterizada por limitación persistente al flujo de aire, que usualmente es progresiva y asociada con una reacción inflamatoria crónica aumentada, en respuesta a partículas o gases nocivos en el pulmón. Las exacerbaciones y comorbilidades contribuyen a la gravedad clínica (1). La gravedad en la limitación al flujo aéreo es determinada por puntos de corte de medidas espirométricas como, Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo (FEV1), Capacidad Vital Forzada (FVC) y su cociente FEV1/FVC y se clasifica en 4 grados (tabla 1).

Tabla 1 Clasificación espirométrica de la gravedad de EPOC

Grado	FEV 1
I Leve	≥80%
II Moderada	<80%
III Grave	<50%
IV Muy grave	<30%

En todos los grados la relación FEV1/FVC debe ser <0.70. Valores de función pulmonar post-broncodilatador

3.2 Epidemiología

Fumar cigarro es el principal factor de riesgo ambiental para desarrollar EPOC, de acuerdo con una encuesta realizada en la Ciudad de México, la prevalencia de fumadores en individuos mayores de 12 años es 43% hombres y de 21% mujeres; la prevalencia de exfumadores es de 30% hombres y de 21% mujeres (2), interesantemente se ha reportado que entre el 10-20% del total de los fumadores desarrolla EPOC, lo cual sugiere que existen otros factores que influyen en el desarrollo de la misma (3), 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 55% (4, 5). Además del tabaquismo, se ha reportado la exposición crónica al humo procedente de la quema de biomasa (particularmente humo de leña) como otro factor ambiental de riesgo a EPOC, observado principalmente en algunos países emergentes, particularmente asiáticos y latinoamericanos (6, 7).

La prevalencia real de la EPOC es incierta, dado que los reportes varían entre los diferentes países y no en todos es posible tomar en cuenta criterios diagnósticos como espirometría u otros datos clínicos; en Europa han sugerido que entre 4-6% de la población adulta padece EPOC, así mismo es una de las principales causas de discapacidad crónica y se prevé que para el año 2020 será la quinta 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 (6). 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 (8).

3.3 Patogénesis

La etiología de la obstrucción de la vía aérea y la destrucción enfisematosa que causa la limitación al flujo de aire es el daño persistente al tejido pulmonar producido por la inhalación crónica de partículas tóxicas y gases (1). En individuos sanos la elasticidad del tejido pulmonar, normalmente mantiene abiertas las vías aéreas durante la espiración; en la EPOC, existe una elasticidad reducida, seguido de un estrechamiento debido a la inflamación, lo cual causa un incremento en la resistencia de la vía aérea y desplazamiento de componentes

principales de los bronquios grandes a la vía aérea (9). La EPOC puede cursar con bronquitis/bronquiolitis, 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/bronquiolitis crónica es definida por producir tos con duración mayor de tres meses, 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 (10).

3.3.1 Obstrucción de las vías aéreas de pequeño calibre

La obstrucción inicia 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 (11). El lumen de las vías pequeñas es reducido por un engrosamiento de la mucosa que contiene exudado inflamatorio, el cual incrementa con la gravedad de la enfermedad. El mecanismo de formación del folículo linfoide es aún desconocido, pero puede ser en respuesta a la colonización bacteriana crónica y exacerbaciones agudas (12).

3.3.2 Destrucción alveolar

Los alvéolos están compuestos de una red virtual que incluye principalmente neumocitos tipo I y II, células endoteliales y fibroblastos, esta red estructural 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 componentes de esta red, son dañados continuamente por agentes irritantes. El enfisema consiste en una respuesta al daño de las células alveolares en la cual los elementos estructurales desaparecen provocando disminución en el área de intercambio capilar (13), su patología se relaciona a cambios

inflamatorios en las vías aéreas y pérdida de las estructuras alveolares y vesículas pequeñas (14). Las septas alveolares son infiltradas por neutrófilos, grupos de macrófagos CD68+ y linfocitos (11). Fisiológicamente se caracteriza por limitación grave al flujo de aire; patológicamente, existe dilatación de los sacos aéreos distales a los bronquiolos secundarios, derivado de la destrucción de la pared alveolar (15), muy frecuentemente se desarrolla entre los 45-60 años de edad como un componente de la EPOC en fumadores (16), sin embargo la destrucción pulmonar enfisematosa se ha reportado en otras enfermedades no relacionadas al tabaquismo, como infección por VIH o neumonitis por hipersensibilidad (14). En general, en los eventos que acontecen en la EPOC, el principal fenómeno es la inflamación.

3.4 Mecanismos moleculares

Los mecanismos por los cuales el humo del cigarro activa el sistema inmune aún son inciertos, sin embargo, se ha aislado una glucoproteína del cigarro, de la que se conocen actividades inmunoestimuladoras (17); Este agente irritante así como moléculas orgánicas contenidas en el cigarro, activan células epiteliales y macrófagos, los cuales liberan múltiples citocinas y factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), que estimulan la proliferación de fibroblastos, resultando en fibrosis de las vías aéreas pequeñas. Estas células también pueden secretar citocinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina 1- β (IL1- β) e interleucina-8 (IL-8) además de diversas quimiocinas que atraen a células circulantes a los pulmones. CCL2 actúa vía CCR2 para atraer a monocitos (los cuales se pueden diferenciar en macrófagos en el pulmón); CXCL1 y CXCL8 actúan vía CXCR2 para atraer a neutrófilos y monocitos; CXCL9, CXCL10 y CXCL11 actúan vía CXCR3 para atraer a células Th1 y Tc1, ambas liberan IFN- γ , quien a su vez estimula la liberación de más

quimiocinas de unión a CXCR3. La hipersecreción de moco es estimulada por EGF, TGF- β , CTGF y factor de crecimiento de tejido conectivo (18) figura 1.

Figura 1 Mecanismos moleculares de daño en EPOC

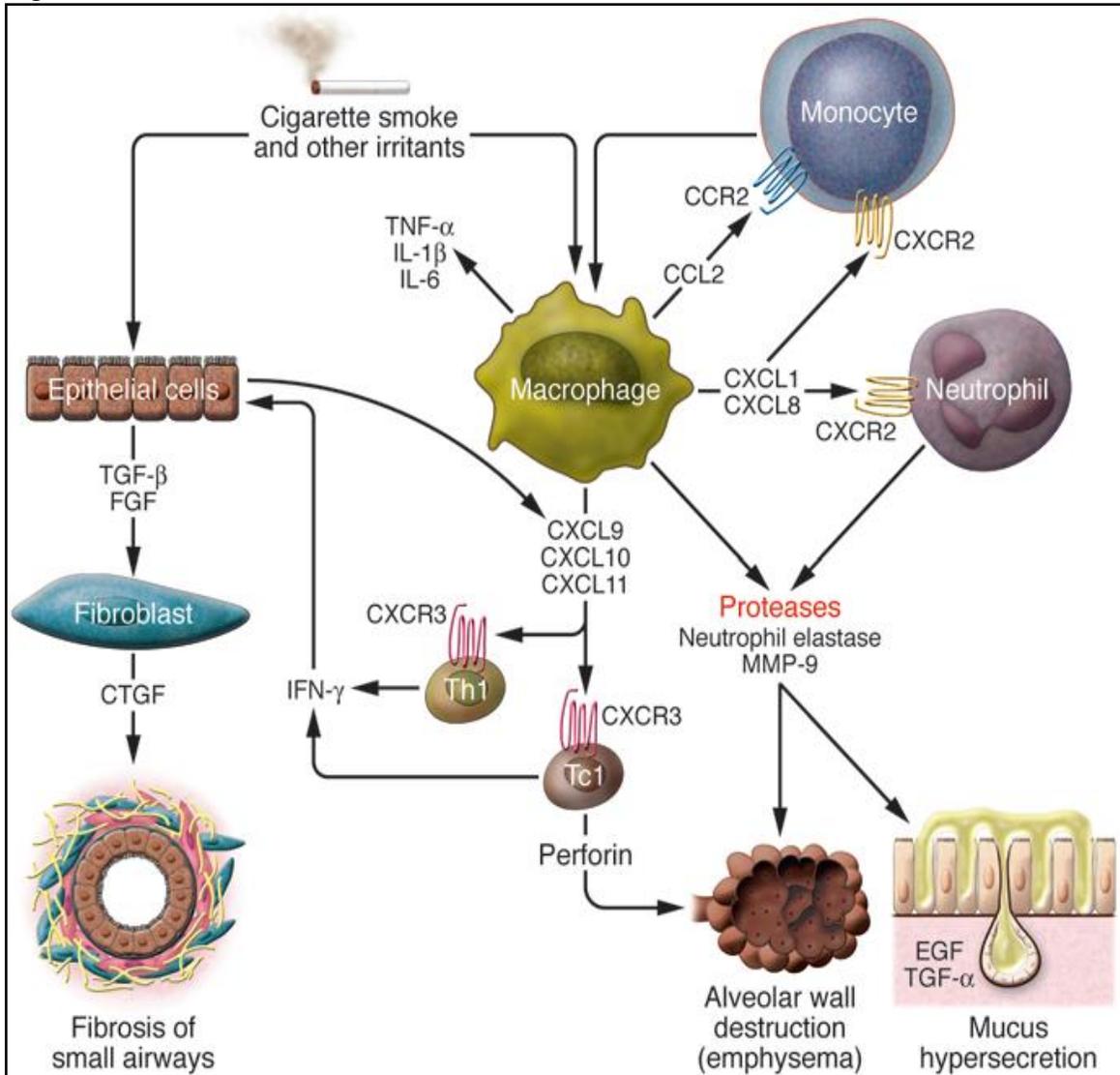


Imagen modificada de referencia 18

3.5 Hipótesis de iniciación de la EPOC

Existen dos hipótesis que tratan de explicar los mecanismos de iniciación del daño en EPOC:

1) desequilibrio en el sistema proteasas/anti-proteasas y 2) desequilibrio en el sistema oxidantes/anti-oxidantes (19).

3.5.1 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 neutrófilo en el tracto respiratorio bajo y que está asociada con el inicio temprano de enfisema panlobular severo (20); en segundo lugar, la instilación de papaína (una enzima con actividad de elastasa) en pulmón de rata, resulta en expansión progresiva del espacio aéreo (21). 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 a las proteínas de la matriz extracelular y componentes de la pared alveolar (especialmente las fibras elásticas), produciendo destrucción y pérdida de la pared alveolar y engrosamiento de la vía aérea (22).

Las proteasas son enzimas que rompen los puentes peptídicos internos de polipéptidos, 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 (23). 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 (24). Una clara consecuencia es que las proteasas, por ejemplo, la elastasa de neutrófilo, 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. Las proteasas, incluida la elastasa de neutrófilo, juegan un papel importante en las reacciones contra la invasión de microorganismos (25).

3.5.1.1 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 (20). Eriksson demostró que los 5 pacientes tenían enfisema con edades de 35, 38 y 44 años, además de historia familiar de enfisema (21).

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 (21) 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 (26, 27).

3.5.1.2 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 de manera independiente en los hijos al 50% (28, 29).

Este gen se caracteriza por su gran polimorfismo. Mediante isoelectroenfoque (IEF) se han identificado más de 70 variantes proteicas (28), y con el avance de las técnicas de identificación, el número alcanza las 100 (30). 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 (28).

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 (31). Cuando se descubrieron nuevas variantes, se designó con las letras iniciales del alfabeto a las anódicas y con las finales a las catódicas (28). 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% menos respectivamente, con respecto a los niveles normales (genotipo MM) (30). 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 (32), 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 (28). 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.

3.5.1.3 Subtipos PiM

PiMM es el genotipo común (“normal”) del gen *SERPINA1*, las diferentes variantes alélicas de este 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 (33). 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 (34). 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 deben ser tomados con cautela, puesto que el tamaño de la muestra empleada no es ideal (35).

3.5.1.4 Otros inhibidores de proteasas

Otros inhibidores de serin proteasas tales como α -1 antiqumiotripsina (ACT), α -2 macroglobulina (α 2MG), antitrombina y antiplasmina son importantes en el control de la actividad de serinproteasas; estos últimos son producidos por el hígado y alcanzan los tejidos blanco por difusión pasiva (36), 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 (37). 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 este 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 esta 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 (38).

3.5.2 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 ácidos grasos poliinsaturados de membrana; si esta reacción no cesa, puede ocasionar daño permanente en membranas, causando muerte celular (39, 40). Adicionalmente, 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 (41). 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 las especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) activan la señalización MAPK (protein-quinasas activadas por mitógenos) lo cual promueve inflamación. Un ejemplo de esto es la inhibición de la cinasa c-Jun amino-terminal en ratón atenuada con ozono, que induce inflamación e hiperreactividad (42). 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) (40, 43). 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 (43).

3.6 Inflamación

La inflamación es una reacción compleja que se origina en el tejido conjuntivo vascularizado como respuesta a diferentes estímulos endógenos y exógenos, una de sus principales características es la acumulación de fluido y células en los tejidos extravasculares. Es útil para contener, localizar y destruir al agente patógeno y simultáneamente iniciar una serie de acontecimientos que reparan y reconstruyen el tejido lesionado. Es fundamentalmente una respuesta de carácter protector, cuyo objetivo es librar al organismo de la causa inicial de la lesión celular, así como de las células y restos tisulares necróticos; no obstante, los procesos de inflamación pueden ser perjudiciales. (44). La respuesta inflamatoria puede ser inducida por factores endógenos o exógenos. La primera categoría incluye reacciones inmunopatológicas además de algunos desórdenes neurológicos y genéticos. Los factores exógenos incluyen daño tisular, exposición a químicos o toxinas, factores nutritivos y organismos invasores (virus, bacterias, parásitos y hongos). La respuesta inflamatoria local puede iniciar con la liberación de moléculas como histamina, serotonina y bradicinina en las áreas de lesión. Estos mediadores endógenos causan vasodilatación, migración de neutrófilos, quimiotaxis e incremento de la permeabilidad vascular. La respuesta inflamatoria generalizada puede iniciar por el ingreso a la circulación sistémica de desencadenantes primarios (bacterias o virus) o mediadores inflamatorios en zonas más grandes del organismo (45). La inflamación tiene dos fases bien diferenciadas: aguda y crónica. La fase aguda tiene una evolución relativamente breve, con duración de unos minutos hasta pocos días; sus características principales son la exudación de fluido, proteínas plasmáticas (edema) y

migración de leucocitos. La fase crónica tiene mayor duración y se caracteriza por cambios celulares e histológicos, principalmente la presencia de linfocitos y macrófagos, proliferación de vasos sanguíneos y tejido conjuntivo. Las respuestas vascular y celular de las formas aguda y crónica están mediadas por factores químicos y celulares del plasma, que son activados por el propio estímulo inflamatorio. Estos mediadores actúan de forma aislada, secuencial o en combinación, y en fases posteriores amplifican la respuesta inflamatoria e influyen en su evolución. La inflamación termina cuando se elimina el estímulo lesivo y desaparecen o quedan inhibidos los mediadores de la misma (46).

3.6.1 Mediadores químicos de la inflamación

Se han descrito una gran diversidad de mediadores, que desarrollan un papel importante en la inflamación, estos pueden estimular la liberación de otros por parte de las células diana o pueden actuar sobre uno o varios tipos de células diana y a su vez el efecto puede ser diferente según el tipo de célula o tejido sobre el que actúa. Una vez activados o liberados de la célula rápidamente se degradan o son inactivados por acción de enzimas. Los mediadores químicos pueden ser clasificados como lipídicos, proteasas plasmáticas, aminas vasoactivas y citocinas (45).

3.6.1.1 Citocinas

Las citocinas son un grupo de polipéptidos solubles que desarrollan un importante papel regulatorio en la iniciación, mantenimiento y terminación de las reacciones inflamatorias (21). Como parte de las moléculas que han sido descritas por formar parte del proceso inflamatorio destacan el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (CXCL8).

3.6.1.1.1 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)

TNF- α es la citocina más estudiada de los miembros de la superfamilia del TNF, experimentalmente es secretada principalmente por macrófagos estimulados con lipopolisacárido (LPS), aunque también lo pueden hacer diferentes tipos celulares como monocitos, fibroblastos y células endoteliales, sin embargo, también puede ser producida por granulocitos, células del músculo liso, eosinófilos, condrocitos, osteoblastos, mastocitos, células de la glía y queratinocitos (47). Se ha demostrado en ratones que causa necrosis de tumores y es por eso que se adoptó el nombre de factor de necrosis tumoral (48). Experimentalmente, TNF- α ocasiona citólisis o citostasis de ciertas células transformadas (49) actuando sinérgicamente con interferón gamma (IFN- γ) (50). La superfamilia de TNF comprende a TNF de transmembrana (tmTNF) y soluble (sTNF) en el contexto de las células/tejidos y fluidos respectivamente (51).

3.6.1.1.1.1 Estructura proteica

Es sintetizado como un pro-péptido de 26kDa (212 aminoácidos) estable como trímero. La estructura de la proteína madura es caracterizada por un dominio intracelular N-terminal y dominio extracelular C-terminal con un dominio C-terminal conservado llamado dominio de homología de TNF (THD, por sus siglas en inglés). THD es una secuencia larga de 150 aminoácidos con un marco conservado de residuos hidrofóbicos y aromáticos. Este dominio trimérico es el responsable de la unión a su receptor (52), el precursor de TNF es cortado proteolíticamente entre alanina -1 y valina +1 para generar una forma biológicamente activa de TNF maduro de 17 kDa (53). En solución, el TNF maduro es primeramente comprimido en dos hojas β anti-paralelas; este monómero es auto asociado en una forma cabeza a cola en una unión no covalente, formando un homotrímero simétrico acampanado (54). La estructura trimérica de TNF es importante para su actividad biológica, porque mutaciones que

desestabilizan el trímero o atenúan la asociación de monómeros resultan en pérdida de la actividad biológica del TNF (55).

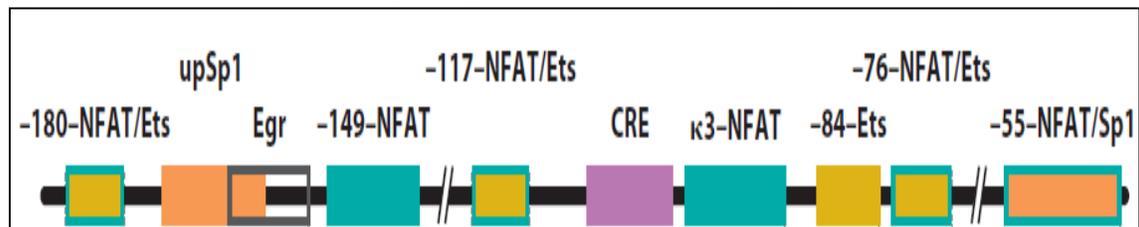
3.6.1.1.1.2 Estructura génica y regulación de la expresión

El gen *TNF* fue clonado en 1984 y mapeado junto con el complejo principal de histocompatibilidad en el cromosoma 6, banda p21.3, junto con los genes que codifican a LT- α y LT- β (56). Está compuesto por 4 exones y 3 intrones, el último exón codifica más del 80% de la proteína secretada (57). Los principales elementos regulatorios, son los elementos de respuesta a NF- κ B, que le confiere inducibilidad por LPS. Sin embargo, muchos otros factores pueden ser implicados para explicar la activación y expresión selectiva de TNF. Los mRNAs de TNF y LT, como muchas otras citocinas, tienen secuencias ricas en AU en la región 3'UTR del mRNA, lo cual disminuye su estabilidad (58, 59). Estas secuencias representan sitios de reconocimientos para mRNA específicos procesadores de proteínas. En 1988 Beutler y cols. identificaron una ribonucleasa que fue aislada de macrófagos de ratón que desestabiliza específicamente mRNA que contienen la secuencia UUAUUUAU en la región 3' UTR (60, 61), presente en el mensajero de TNF. Interesantemente el mRNA de LT carece de estos motivos AU (62). Adicionalmente, TNF- α induce diversas proteínas involucradas en la inflamación, reparación tisular, hematopoyesis, respuesta inmune y efectos anti-tumor. Algunos de estos genes codifican para proteínas llamadas “proteínas de resistencia a TNF”, los cuales pueden inhibir la citotoxicidad de TNF (63). Ejemplos de estas proteínas son la superóxido dismutasa (64), la proteína A-20 dedo de zinc (65) y la proteína de choque térmico-70 (HSP70) (66).

La regulación de la transcripción de TNF es específica del tipo celular, principalmente por el uso diferencial de los elementos regulatorios del promotor del gen. En 1996, Tsai y colaboradores, demostraron que los linfocitos T activados por ligando de células-T o por

calcio, tienen una interacción entre el factor nuclear activador de la transcripción fosforilado (NFATp, por sus siglas en inglés) en la región k3 y el Factor Activador de la Transcripción (ATF/Jun) en los elementos de respuesta a cAMP (CRE), pero no en AP-1 o AP-2, lo cual es importante en la inducción de la expresión de TNF. Por otro lado, este mismo grupo describió que en los linfocitos B A20 activados por calcio, NFATp no es requerido en los elementos k3; pero NFATp en NFAT-76 participa en la inducción de la síntesis de TNF (67). La modificación post-traduccional de los factores de transcripción que regulan a TNF, como NFATp, NFκB y AP-1, se ha implicado en la regulación de la inducción (68). Quizás el factor de transcripción más importante es el factor nuclear para la cadena ligera kappa en células B (NFκB), quien es el responsable de gran parte de los efectos inflamatorios de TNF y otros factores de transcripción como AP-1 (69) (figura2).

Figura 2. Sitios de unión de los principales factores de transcripción de *TNF*



Se muestran los sitios de unión de los principales factores de transcripción en el promotor de TNF, abarcando 180 pb.

3.6.1.1.1.3 Función biológica

Regula una gran variedad de efectos patogénicos e induce la producción de otros mediadores de inflamación y destrucción tisular, siendo el líder de una cascada inflamatoria de una amplia red inflamatoria (70). Los miembros de la superfamilia de TNF participan de manera importante en las funciones celulares. TNF tiene una función dual que inicialmente ha sido descrita en la destrucción y regeneración tisular. Dado que existen diversos motivos en los receptores de TNF, tienen un amplio espectro de bioactividades y muchas células muestran

respuesta selectiva a TNF (71). Las concentraciones de TNF determinan si la citocina tiene efectos benéficos o dañinos. A bajas concentraciones en tejidos, puede tener efectos benéficos, como incremento de los mecanismos de defensa del huésped contra infecciones; sin embargo, por periodos prolongados son asociadas con caquexia. En altas concentraciones, puede conducir a un exceso de inflamación y daño en órganos; en estados patológicos es considerado como citocina pro-inflamatoria, junto con IL-1 β , IL-17 y otras citocinas; además, en respuesta a LPS y otras toxinas bacterianas, puede intervenir el desarrollo de choque séptico (72).

En hipotálamo, TNF estimula el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal, el cual a su vez estimula la liberación de la hormona liberadora de corticotropina, suprimiendo el apetito y fiebre. En el hígado, TNF estimula la respuesta de fase aguda conduciendo a un incremento de proteína C reactiva (CRP por sus siglas en inglés) entre otros mediadores. También induce resistencia a la insulina por inducción de la fosforilación de serina del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1), lo cual daña la señalización de insulina. TNF- α también ha sido involucrado en la progresión a muchas enfermedades autoinmunes (73); en condiciones fisiológicas, está involucrado en inmunovigilancia, defensa, homeostasis celular y protección contra ciertos daños neurológicos, así como en el control de la sobrevivencia celular, proliferación, migración y diferenciación. También tiene funciones protectoras de células reactivas a patógenos a través de la activación o inactivación de factores de transcripción o inducción génica (74).

3.6.1.1.2 Interleucina 6 (IL-6)

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 IL-3 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 (63, 75, 76). Antes de denominarse IL-6, fue conocida con una amplia variedad de nombres, como: IFN- β 2 (77), factor reemplazante de células T (TFR) (78), factor de diferenciación de células B (BCDF) (79), factor-2 estimulante de células-B (BSF2) (80) y factor de crecimiento plasmacitoma-hibridoma (HPGF o IL-HP1) (81).

3.6.1.1.2.1 Estructura Proteica

IL-6 es una glucoproteína con un peso molecular entre 21-28kDa. Tiene modificaciones post-traduccionales como glucosilaciones y fosforilaciones *N*- y *O*- (82,83); cuenta con 4 residuos de cisteína en regiones conservadas y sitios consenso de glucosilación (Asn-Y-Ser/Thr) (84). La IL-6 humana está constituida por 212 aminoácidos incluyendo un péptido señal de 28 aminoácidos (85). Los puentes disulfuro tienen un papel importante en el plegamiento correcto de la estructura terciaria, donde se unen entre los residuos de cisteína -C⁴⁴-C⁵⁰, -C⁷³ y -C⁸³ (84). IL-6 consiste de 4 hélices anti-paralelas con dos bucles largos y dos cortos, similar al modelo de otras citocinas como interleucina-2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (86). La producción de IL-6 es inducida en células T por mitógenos de células T o estimulación antigénica (87). El LPS incrementa la producción de IL-6 en monocitos y fibroblastos, mientras los glucocorticoides la inhiben (88). Diversos factores peptídicos pueden incrementar la producción de IL-6, como IL-1, TNF- α , IL-2, IFN- β , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y protein-cinasa C. En contraste, IL-4 e IL-13 inhiben su producción en monocitos. IL-6 no es almacenada dentro de la célula; al

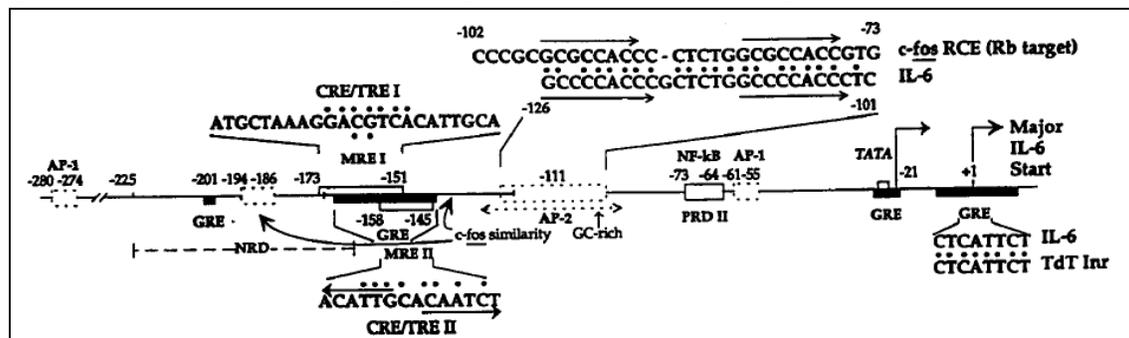
momento de su estimulación e incremento de los niveles de mRNA, ocurre una rápida síntesis y secreción de la proteína. Los monocitos/macrófagos son los primeros en liberar IL-6 durante la inflamación, estos producen IL-1 y TNF- α , los cuales son fuertes inductores de la liberación de IL-6 por parte de poblaciones de células estromales, como fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos. Estos representan un número significativo de células que potencialmente se suman al rápido aumento en la síntesis local de IL-6, y por lo tanto a niveles sistémicos (89). Adicionalmente, otras células se han reportado por producir IL-6 posterior a su estimulación, como células endoteliales con IL-1/TNF u oncostatina M (OSM) (90-92); condrocitos con IL-1 (93); células epiteliales con IL-1/TNF (94), células de estroma de médula ósea con IL-1 (95), astrocitos y microglia con IL-1/TNF (96).

3.6.1.1.2.2 Estructura génica y regulación de la expresión

El gen de *IL6* mide aproximadamente 5kb, está formado por 5 exones y 6 intrones (97) y realiza corte de intrones y empalme de exones para generar un mRNA maduro de 1.2-1.3kb (98). El gen se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 7 entre las bandas 15-21 (87). El sitio mayor de inicio de la transcripción es la base +1 acompañado de un sitio menor a aproximadamente -21 pb (97). La expresión de IL-6 puede ser inducida por un amplio rango de estímulos celulares; diferentes mecanismos pueden actuar individual o coordinadamente para activar la transcripción. A su vez, existen diversos blancos de transducción de señales en la región promotora, estos blancos incluyen las regiones de unión a DNA que son específicas de factores nucleares como el factor nuclear para IL-6 (NFIL6, también llamada proteína de unión a elementos CCAAT, C/EBP β y γ), NF κ B; proteína activadora-1 (AP-1), proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP (CREB), receptor de glucocorticoides (GR) (99-101). Estas secuencias se encuentran a 200 pb del sitio de inicio

de la transcripción. En células estimuladas con IL-1, NFIL-6 y NFκB se unen a su respectivo sitio y activan la síntesis de otros factores de transcripción (102). En 1990 Shimizu *et al.* describieron motivos de unión a NFκB localizados a 73 y 63 pb relacionados al sitio de “capping” del mRNA, los cuales son requeridos para la expresión inducida de IL-6 por IL1/TNF. NFκB también está involucrado en la inducción génica de IL-6 por la proteína reguladora no estructural 1 (NS-1) de parvovirus humano B19 (103-104). En monocitos, el sitio NFκB es crucial para la expresión génica inducida por LPS, en donde adicionalmente se ha descrito la acción sinérgica de IFN-γ y TNF-α a través del factor regulatorio de interferon-1 (IRF-1) y NFκB p65 (105); NFκB es también involucrado en la expresión génica mediada por CD40 (106). Por otro lado, otros elementos que han sido descritos, son los elementos de respuesta a IL-1, los cuales fueron mapeados en la región -111 a -180 pb del promotor, en la cual se unen NF-IL6CCAAT y C/EBP-β a un palíndromo de 14 pb (figura 3) (100, 102).

Figura 3. Sitios de unión de los principales factores de transcripción de *IL6*



Se muestran los sitios de unión de los principales factores de transcripción en el promotor de *IL6*, abarcando 280pb.

3.6.1.1.2.3 Función biológica

IL-6 es una citocina pro-inflamatoria que tiene un papel clave en la respuesta inmune. Durante la inflamación, IL-6 es producida por una pluralidad de células del sitio de inflamación y contribuye a la inflamación local por la inducción de la activación de células T y la producción de anticuerpos por células B. IL-6 también activa células no inmunes como células endoteliales las cuales producen moléculas de adhesión y quimioatrayentes. Adicionalmente, la producción local de IL-6 produce el incremento de IL-6 en circulación, lo que a su vez induce una respuesta de fase aguda sistémica con la producción de CRP (Proteína C reactiva), amiloide A sérico y fibrinógeno, todas ellas en el hígado (107-108). La respuesta del hígado disminuye en un período de horas a días, dependiendo del estímulo mientras que los niveles séricos disminuyen en 3-5 días. IL-6 tiene un importante papel en la regulación del equilibrio de células T reguladoras Foxp3⁺ y Th17, a través de la supresión de TGF- β , conduciendo a la diferenciación de células Th17. Otro efecto importante que se ha descrito de IL-6 en células estructurales locales, es la regulación de la expresión en células de tejido conectivo, como los fibroblastos derivados de diversos tejidos y condrocitos, además de ser un modulador del crecimiento en queratinocitos (109) y células endoteliales (82). IL-6 induce el inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP-1) en fibroblastos y condrocitos (110). La importancia de este evento radica en que la degradación enzimática del colágeno en tejidos, es controlada por la acción de metaloproteinasas y sus inhibidores; el control de este equilibrio por IL-6 y otras citocinas puede contribuir al rompimiento de la matriz extracelular (108, 111). Adicionalmente, se ha demostrado que IL-6 mejora la producción de α 1-antitripsina por macrófagos alveolares. Es por esto, que la sobre regulación tanto de inhibidores de metaloproteinasas como de inhibidores de serin proteasas por las células en el sitio de inflamación, es un mecanismo de modulación de la degradación

enzimática del tejido. IL-6 puede mostrar efectos en otros sistemas del organismo, como el neurológico, donde genera una respuesta inflamatoria aguda, en células de la glándula pituitaria donde incrementa la producción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH).

3.6.1.1.3 Interleucina 8 (CXCL8)

La interleucina-8 (CXCL8) fue descubierta por diversos grupos simultáneamente, resultando en una gran cantidad de denominaciones, todos basados en su actividad biológica, que permitió su identificación inicial, algunos de estos nombres son, factor activador de neutrófilos (112), factor quimiotáctico de neutrófilos derivado de monocitos (MDNCF) (113), péptido activador de neutrófilos derivado de monocitos (MONAP) y péptido activador de neutrófilos derivado de linfocitos (LYNAP) (114), factor quimiotáctico de granulocitos (GCP) (115), quimiotaxina derivada de monocitos (MOC) (116), y quimiocina derivada de carcinoma pulmonar (LUCT), (117). Posteriormente, el nombre de péptido activador de neutrófilos-1 (NAP-1) fue adoptado, pero la molécula fue finalmente llamada IL-8. IL-8 es un miembro de citocinas quimiotácticas (también llamadas quimiocinas).

3.6.1.1.3.1 La familia de las quimiocinas

Se caracterizan por la presencia de 4 cisteínas en posiciones conservadas, aunque la similitud general a nivel de aminoácidos no es tan grande. Se forman dos puentes de disulfuro entre el primer y tercer residuo de cisteína y otro entre el segundo y cuarto. Son proteínas de bajo peso molecular de una naturaleza básica y con afinidad por la heparina (118). Las quimiocinas son divididas en cuatro subgrupos: CXC, CC, C y CX₃C; CXC, CC y CX₃C tienen 4 cisteínas, mientras que las quimiocinas C solo tienen dos, que corresponden a la segunda y cuarta cisteína de los otros grupos. CXC y CX₃C son distinguidas por la presencia de un residuo (CXC) y tres aminoácidos (CX₃C), mientras que las dos primeras cisteínas son

adyacentes en las quimiocinas CC (119). Este sistema de nomenclatura fue modificado posteriormente en el año 2000, adicionando a la raíz de la subclase de cisteína el sufijo L o R, designando L si se trata del ligando o R si se habla del receptor. Los números corresponden usualmente al mismo número correspondiente a la nomenclatura del gen (120).

3.6.1.1.3.2 Estructura proteica de CXCL8

CXCL8 es producida como un péptido no glucosilado de 99 aminoácidos, en el cual, el péptido señal se encuentra en el extremo N-terminal. La proteína madura de CXCL8 existe en múltiples formas, como consecuencia del procesamiento del extremo N-terminal. La forma de 77 aminoácidos es producida por células endoteliales (120) mientras que los monocitos producen formas de 72, adicionalmente producen pequeñas cantidades de 77, 70 y 69 (121).

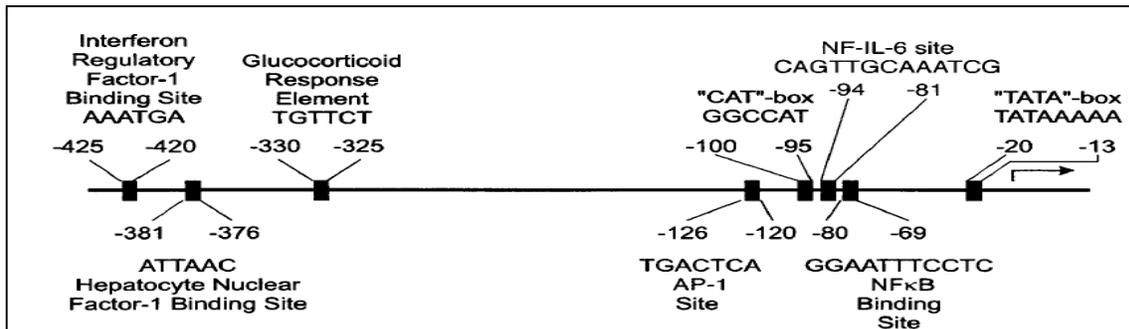
La actividad biológica de CXCL8 depende de ciertas características moleculares, particularmente de los dos puentes de cisteína, los cuales son la principal característica de las quimiocinas y que son esenciales para su actividad. En la región N-terminal, la secuencia Glu-Leu-Arg es necesaria para la activación funcional de su receptor; las quimiocinas C-X-C que no tienen este motivo no pueden activar neutrófilos (122). Por otro lado, el efecto angiogénico también depende este motivo (123).

3.6.1.1.3.3 Estructura génica y regulación de la expresión de CXCL8

CXCL8 es codificada por un transcrito de mRNA de cadena sencilla de aproximadamente 1.8 kb (124). El gen de *CXCL8* comprende 4 exones y tres intrones; mide aproximadamente 5.25 kb y se encuentra situado en un tándem con otras quimiocinas C-X-C en el cromosoma 4, banda q12-21. La activación estímulo-dependiente de la transcripción del gen de *CXCL8* se ha demostrado a través de diversos experimentos. Se ha encontrado que la secuencia que

abarca los nucleótidos -1 a -133 en el promotor del gen, es suficiente y esencial para la regulación del gen (125). Esta región contiene elementos de unión a NFκB que son requeridos para la activación de todos los tipos celulares estudiados. NFκB es un factor de transcripción dimérico compuesto de 5 subunidades, llamadas NFκB1 (p50 y su precursor p105), NFκB2 (p52 y su precursor p100), REL-A (P65) y REL-B (126). NFκB es retenido en el citoplasma por unión a sus proteínas inhibitorias (IκB). Dentro del promotor se encuentran regiones donde se unen factores de transcripción como AP-1 y C/EBP, las cuales en algunas células contribuyen a la activación transcripcional. *CXCL8* también es regulada a nivel post-traducciona. En la región flanqueante 3', contiene repetidos ATTTA, los cuales son los responsables para la desestabilización de diversos mRNAs de citocinas (figura 4) (127).

Figura 4. Sitios de unión de los principales factores de transcripción de *IL8*



Se muestran los sitios de unión de los principales factores de transcripción en el promotor de *IL8*, abarcando 425pb.

3.6.1.1.3.4 Función biológica de *CXCL8*

Diversas células se han descrito por producir *CXCL8*, como monocitos, macrófagos, células endoteliales, linfocitos, células epiteliales, células de musculo liso, células mesangiales de riñón, condrocitos, células sinoviales, hepatocitos, fibroblastos, queratinocitos, astrocitos,

neutrófilos y células tumorales como células de melanoma, carcinoma de ovario y células de carcinoma pulmonar (128-129).

Originalmente fue caracterizada por su capacidad para inducir naturalmente activación de neutrófilos (130). Sin embargo, aunque los neutrófilos son el principal blanco celular de esta quimiocina, los efectos no son restringidos exclusivamente a estos. Se ha reportado que en conjunto a GM-CSF o IL-3 es quimioatrayente de eosinófilos, además de inducir la liberación de histamina y LTC₄ por basófilos, en conjunto con IL-3 (131). También se ha reportado la actividad quimiotáctica de células T (132), producción de IL-4 en células B (121), así como la inducción de angiogénesis y quimiotaxis de queratinocitos (133). Todas estas evidencias sirvieron de base para sugerir la participación de esta molécula en distintas enfermedades como cáncer esofágico de células escamosas (134), cáncer de mama y urotelial (135). En relación a enfermedades crónico-inflamatorias, se han reportado asociación entre los niveles de expresión de IL-8 y la activación de NFκB en pacientes con artritis reumatoide (136).

3.7 Inflamación en EPOC

La EPOC es 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 y depresión (12). 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 (13).

3.8 Inflamación pulmonar

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

respiratorio, hiperinflación pulmonar con pérdida de la reactividad elástica y finalmente intercambio gaseoso alterado. 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 (11). La inflamación del parénquima pulmonar, el estrés oxidativo, apoptosis y eventual proteólisis resulta en destrucción enfisematosa de la pared alveolar (137).

4.0 Antecedentes

El sistema de defensa innato del pulmón incluye el aparato de limpieza mucociliar (138) y la barrera epitelial (139), así como las cascadas de coagulación e inflamación, que detienen los sangrados microscópicos asociados a daño tisular y que conducen a un exudado de plasma y migración de células inflamatorias en el sitio de daño y la liberación de moléculas pro-inflamatorias (140).

El estudio de enfermedades pulmonares, con la finalidad de obtener conocimiento en relación a los biomarcadores inflamatorios, se ha centrado en la determinación de sus niveles tanto locales como sistémicos, así como de polimorfismos en los genes que los codifican.

En relación a TNF- α , es una molécula ampliamente investigada en EPOC; en 2010 Tanni y cols. Encontraron correlación en el status de tabaquismo y los niveles séricos de TNF- α , siendo el grupo de pacientes con EPOC, lo que tuvieron los valores más altos (141). 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 (142). En estudios de asociación genética con EPOC, existen estudios que muestran cierta relevancia para el rs1800629 (posición -308 G \rightarrow A) de *TNF* en poblaciones asiáticas, pero no en poblaciones caucásicas (143). En 2012 se realizó un estudio en población taiwanesa, en el cual se identificó al *TNF* rs1800630 (-863 C \rightarrow A) con una mejora en el cociente FEV1/FVC y con el incremento del índice de masa corporal (144).

Respecto a IL-6 y su asociación con enfermedades respiratorias, en asma se han encontrado niveles séricos elevados de IL-6 (145), así como en lavado bronquioalveolar, comparándolos con individuos no fumadores, tanto con asma estable como no asmáticos (146). Adicionalmente en un estudio realizado por Neveu y cols., en 2010, se demostró un incremento en los niveles de IL-6 e IL-13 en esputo de pacientes con asma alérgica,

interesantemente IL-1 β y TNF- α no resultaron incrementados (147), lo cual propone un incremento de IL-6, independiente del grado de inflamación. En EPOC, las concentraciones de IL-6 se han descrito incrementadas en esputo inducido, lavado bronquioalveolar y concentrado de aire exhalado, particularmente durante exacerbaciones (148-150). La IL-6, también se incrementa en plasma durante las exacerbaciones (151-152). En 2008, He J-Q y cols. encontraron 3 SNP en IL-6 asociados con un mayor decline de la función pulmonar en pacientes con EPOC secundaria a tabaquismo, pero sin correlación con los niveles séricos de la proteína, en población caucásica (153).

En el caso de IL-8 y su asociación con enfermedades inflamatorias pulmonares, en un estudio prospectivo realizado por Tadaki y cols. en Japón, encontraron niveles séricos elevados en cordón umbilical que correlacionan con el desarrollo de sibilancias en el primer año de vida (154), en cuanto a asma, su participación no ha sido confirmada, ya que en otros estudios no se han encontrado asociaciones con sus niveles o polimorfismos. Con respecto a EPOC, su función aún es incierta, aunque hay estudios de asociación tanto genética como con niveles séricos y/o plasmáticos con esta enfermedad. Por ejemplo, Yamamoto y su grupo de trabajo reportaron valores elevados en esputo en pacientes con EPOC en comparación a diferentes grupos control (155). Consistente con este hallazgo Keatings y cols, describieron valores elevados en esputo inducido de pacientes con EPOC en comparación a diferentes grupos control (156). En cuanto a asociaciones de polimorfismos con la enfermedad, Jeremy Hull y cols. (2001), encontraron asociado al polimorfismo *IL8*-251A con bronquiolitis en un estudio de familias realizado en el Reino Unido (125). Aun así, no existen estudios que propongan el papel que desempeñan estos polimorfismos a la enfermedad. Recientemente, Alfredo de Diego y cols., determinaron los valores en esputo de diferentes citocinas, entre ellas IL-8,

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 IL-8 y TNF- α , lo cual sugiere que estas moléculas pueden incrementarse en la EPOC, en respuesta al estímulo del humo de cigarro (126). En la tabla 2 de resumen los principales hallazgos en EPOC.

Tabla 2. Principales antecedentes en EPOC

Proteína/gen	Población	Hallazgo en EPOC	p, OR	Autor
CCL1	Japón	Frecuencia ↑↑ del rs2282691	(p=0.004, OR=2.70)	Takabatake N 2006 .
CSF2	China	-351 se encontró ↑↑ en pacientes con EPOC	(p=0.029, OR= 2.44)	Shen M 2008.
IL1b	Corea del Sur	-511 T y -31C Asociados con EPOC grave	(p=0.002 OR= 2.80, p=0.01 OR= 2.33)	Lee JM 2008.
CRP	EUA, China	Niveles séricos ↑↑ en EPOC y fumadores sin enf. pulmonar, rs1205 asociado con EPOC.	(p=0.00012 OR=9.51, p=0.037 OR=1.48)	Pinto-Plata M 2006. Guo Y 2011.
TNF	España, Taiwán	Niveles ↑↑ en esputo y LBA, rs1800630 (protección), rs1800629 (susceptibilidad).	(p=0.001 OR=3.22, p=0.001 OR=0.50, p=0.0127, OR=3.02)	Gan WQ 2001, Córdoba-Lanús 2011
IL6	Inglaterra	↑↑ en esputo, LBA y plasma en exacerbaciones de EPOC.	(p=0.0021 OR=2.81, p=0.0141, OR=1.83)	Bhowmik 2000, Song W 2001
IL8	Inglaterra	Altas concentraciones en esputo de pacientes con EPOC.	(p=0.01 OR= 1.82, p=0.0276, OR=1.67)	Keatings 1996

↑↑=Incremento, LBA=Lavado bronquioalveolar.

5.0 Hipótesis

Existen polimorfismos en los promotores de *TNF*, *IL6* e *IL8*, que se encuentran relacionados con los niveles de expresión en esputo inducido con el desarrollo de la EPOC y su gravedad clínica.

6.0 Objetivo General

Identificar si existen polimorfismos en los promotores de *TNF*, *IL6* e *IL8* que se encuentran relacionados con los niveles de expresión en esputo inducido de pacientes con EPOC secundaria a tabaquismo, así como con la gravedad clínica de la enfermedad.

6.1 Objetivos Particulares

6.1.1 Secuenciar la región promotora de interés de *TNF*, *IL6* e *IL8*.

6.1.2 Correlacionar los polimorfismos encontrados con los niveles de expresión en esputo inducido, así como con la gravedad clínica de la enfermedad.

7.0 Diseño del estudio

7.1 Población de estudio

Se realizó un estudio de casos y controles en dos etapas; se incluyeron 1,096 participantes, todos fueron evaluados por medio de pruebas de función pulmonar considerando como EPOC un cociente FEV1/FVC <70%; el principal criterio de diagnóstico 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 (157), los cuales están estandarizados para población mexicana y precargados en los espirómetros comerciales en México.

Se incluyeron individuos mayores de 50 años e índice tabáquico ≥ 5 paquetes/año; se les realizó un cuestionario de antecedentes heredo-patológicos, mediante el cual se excluyeron a sujetos que refirieran padecer alguna enfermedad pulmonar y/o crónico-inflamatoria, no fueron incluidos sujetos con ancestría diferente a la mexicana. Todos los participantes fueron reclutados de las clínicas de EPOC y de ayuda para dejar de fumar, ambas pertenecientes al Departamento de Investigación en Tabaquismo y EPOC, del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. Fueron previamente invitados a

participar, firmaron una carta de consentimiento informado y se les proporcionó un documento de aseguramiento de privacidad de datos personales, ambos aprobados por el comité de ciencia y bioética en investigación del mismo instituto (B10-12).

7.2 Etapas

En la primera se incluyeron 165 pacientes con diagnóstico de EPOC secundaria a tabaquismo (EPT) y 165 fumadores sin la enfermedad (FSE); se realiza la secuenciación directa de la región del promotor de *TNF*, *IL6* e *IL8*. En la segunda se realiza la validación de la asociación de los polimorfismos identificados en la primera etapa, empleando discriminación alélica por PCR en tiempo real, se incluyeron 766 fumadores; de los cuales 260 son COPD y 506 SNC. Finalmente, para realizar el análisis de expresión de mRNA, Se incluyeron 15 sujetos con EPOC por tabaquismo y 38 fumadores sin la enfermedad a los cuales se les realizaron la inducción de esputo por nebulización con solución salina al 7%.

7.3 Definición de caso y control

Caso: Pacientes hombres y mujeres mayores de 50 años de edad, con EPOC secundaria a tabaquismo confirmada por diagnóstico clínico y radiológico, con antecedentes de hábito tabáquico mayor de 10 cigarros al día por más de 10 años, denominados en adelante con la clave EPT.

Control: Individuos hombres y mujeres mayores de 50 años de edad, 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 FSE.

7.4 Criterios de inclusión, no inclusión y eliminación

7.4.1 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.

7.4.2 Criterios de no inclusión:

Enfermedades pulmonares agregadas diferentes a EPOC que alteren la función pulmonar.

Enfermedades de tipo inflamatorio.

Sujetos con contraindicación para realizar la espirometría.

7.4.3 Criterios de eliminación:

Muestra biológica insuficiente 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 obtiene DNA genómico utilizando el estuche comercial *BD tract DNA isolation kit* (Maxim Biotech, San Francisco CA, USA). El DNA Se cuantifica por espectrofotometría de absorción de luz ultravioleta a 260 nm de longitud de onda, empleando un equipo nanodrop (Thermo Scientific, DE, USA). La contaminación con compuestos orgánicos y proteínas se determina al establecer la relación de las lecturas 260/240 y 260/280 respectivamente; las muestras se consideran libres de contaminantes cuando en ambos casos la relación se encontró entre 1.7-2.0.

8.2 Selección y diseño de regiones a secuenciar

Las regiones de interés seleccionadas se eligen con base en los reportes bibliográficos previos, en los cuales se identifican regiones reguladoras en las que se unen diferentes factores de transcripción (67-69). Las regiones de interés constaron de aproximadamente 500 pb para *TNF*, 750 pb para *IL6* y 600 para *IL8*; se seleccionan de la base de datos del NCBI la secuencia que comprendiera esta región. Empleando la herramienta primer-BLAST de NCBI se diseñan los *primers* teniendo como valor de GC% <65%, TM <60°C y un tamaño de *primer* <25pb (tabla 3).

Tabla 3 Secuencias de los primers utilizados.

Primer	Secuencia	pb	TM	GC%
IL6_Prom1_F	TGTA AACGACGGCCAGT AAGTGGGCT	22	58	59.09
IL6_Prom1_R	CAGGAAACAGCTATGACC AAGCAGAACCA	24	59.1	54.17
IL8_Prom_1_F	TGTA AACGACGGCCAGT AATGATTGGCTGGC	27	59.6	48.15
IL8_Prom1_R	CAGGAAACAGCTATGACC ATATCATCACCT	26	57	46.15
TNF_Prom1_F	TGTA AACGACGGCCAGT CATGGGGAC	22	58.7	59.09
TNF_Prom1_R	CAGGAAACAGCTATGACC GAGAGGAG	21	59.4	66.67

En rojo la secuencia forward primer M13, en azul la secuencia reverse primer M13, TM=Temperatura de fusión, %GC= Porcentaje de Guanina-Citocina.

8.3 Secuenciación bidireccional

La secuenciación se realiza por medio del estuche comercial Bigdye Direct cycle sequencing (Applied Biosystem, Foster City, CA.), para lo cual se ajusta la concentración de DNA a 4ng/μL y se verifica la integridad del DNA mediante corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2%. La amplificación por PCR se lleva a cabo con el siguiente programa de amplificación: 95°C 10 min 1 ciclo; 96°C 3 seg, 62°C 15 seg, 68°C 30 seg por 35 ciclos; 72 °C 2min, 4°C hasta el siguiente paso. La reacción de secuenciación se realiza con los siguientes ciclos: 37°C 15min, 80°C 2min, 96°C 1min por 1 ciclo; 96 °C 10 seg, 50 °C 5 seg, 60 °C 75 seg por 25 ciclos; 4°C hasta purificación, el producto obtenido se purifica mediante precipitación con etanol/EDTA. La inyección capilar se realiza en un analizador genético ABI 3130 (Applied Biosystem, Foster City, CA.) utilizando como archivo de movilidad DT3130POP7{BD}v2.mob, en un módulo de análisis RapidSeq36_POP7_1, inyectando a 1-1.5kV de 5-10 segundos, recolectando datos durante 1,800 segundos y revisando los mismos con el software Sequencing Análisis v5.4.

8.4 Alineación de secuencias

Para identificar los conjuntos de alineación, se emplea el algoritmo “*contig assembly*” en el software *Sequencher 5.1* (GeneCodes, Ann Arbor, MI), usando “*assemble automatically*” con “*minimum match percentage*” de 80 y “*minimum overlap*” de 100 pb. La secuencia de referencia se importa de la base de datos del NCBI. A partir de los datos obtenidos de la base de datos de *ensembl*, al conjunto de muestras que compartían una secuencia consenso se les define como “*contig*”. Se determinan los polimorfismos y su posición dentro de la secuencia, todos se asignan tomando en cuenta el solapamiento de los picos en los electroferogramas.

8.5 Discriminación alélica para genotipificación de SNP

Se genotificaron 5 SNP en *TNF* y 6 en *IL6*; los polimorfismos incluidos fueron rs1800629, rs56036015, rs4987027, rs673, rs361525 y rs41297589 en *TNF*, rs140838807, rs186909159, rs1800797, rs1800796 y rs192273987 en *IL6*). La discriminación se realiza mediante 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.

Tabla 4. Ciclos y temperaturas de PCR en tiempo real.

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 incluyen 4 controles de contaminación por cada placa, denominados como No Template Controls (NTC). El software que se utiliza es el Sequence Detection Software versión 1.4. Se crean 2 archivos, uno para discriminación alélica (extensión .AD) y uno para

cuantificación absoluta (extensión .AQ). Los detectores de señal de fluorescencia son VIC el cual se asignó para alelo B y FAM que asigno alelo A en todos los casos.

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

Tabla 5. Componentes de la reacción de PCR en tiempo real para genotipificación.

Componentes	Volúmenes
TaqMan Genotyping Master Mix*	200 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.

8.6 Inducción de esputo

El esputo se obtiene al nebulizar a los participantes con solución salina al 7%, la nebulización se realiza por periodos de 5 min cuatro veces, una vez concluido el procedimiento se le pide al paciente que se lave la boca con agua y posteriormente expectore en un recipiente para la recolección de la muestra. Una vez obtenida la muestra, la flema se separa de la saliva en una caja Petri con ayuda de hisopos estériles, posteriormente se coloca un tubo de polipropileno de 50 mL, se le agrega 4 volúmenes de buffer salino de fosfatos (PBS) al 1% y se disgrega mecánicamente, primeramente con jeringa de insulina y posteriormente de 20 mL, se centrifuga a 3600 rpm durante 30 min, se recupera el sobrenadante y se crioconserva a -70 °C, el botón celular se resuspende en 8 mL de PBS al 1% y se centrifuga a 1600 rpm durante 10 min, se desecha el sobrenadante y el pellet se vuelve a resuspender con 1 mL de PBS. La muestra se centrifuga a 1,600 rpm durante 10 min, el sobrenadante se desecha y el pellet se resuspende en 500 μ L de medio de cultivo Red Phenol Medium Indicator (RPMI), se trasvasa a criotubos donde se le agrega 400 μ L medio RPMI con 100 μ L de dimetilsulfoxido (DMSO) y se conserva -20 °C.

8.7 Expresión de mRNA por sondas Taqman

El mRNA se extrae a partir de células pulmonares obtenidas de esputo inducido, mediante el método Trizol/cloroformo, posteriormente se hidrata en 30 μ L. El mRNA se convierte a cDNA empleando el estuche comercial *Revert Aid First Strand cDNA Synthesis kit* (Thermo scientific, DE, USA); se comprueba la existencia del material genético utilizando primers específicos para β -Globina (One Lambda Inc. Canoga Park, CA, USA).

Se realiza una curva estándar de concentración de cDNA, obtenido de sangre periférica, para *TNF* e *IL6* y *GAPDH* como control endógeno, la curva se establece de 0.01-100 ng/ μ L, con 5 puntos y factor de dilución 1:10 para TNF; para IL6 fue de 61.7-5,000 ng/ μ L con 5 puntos y factor de dilución 1:3. Las muestras se ajustan a 25 ng/ μ L y se agregan los demás componentes como se describe en la siguiente tabla:

Tabla 6 Componentes de reacción de qPCR

Componente	Volumen (μ L)
20 \times TaqMan Gene Expression Assay*	1
2 \times TaqMan Gene Expression Master Mix†	10
cDNA (25 ng/ μ L)	4
Agua libre de nucleasas	5

* Sonda comercial para IL6 o GAPDH como control endógeno, † La mezcla de reacción utilizada contiene UNG (Uracil-N-glucosilasa).

El programa de ciclaje utilizado es el mismo descrito en la tabla 3.

Los resultados obtenidos son analizados en el software *7500 fast real time v2.0.6*, usando el método comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$) para calcular la concentración relativa de expresión génica.

8.8 Análisis Estadístico

Las diferencias entre los dos grupos en estudio se evalúan mediante la determinación y comparación de las frecuencias de perfiles, de genotipos y alelos. Se emplean tablas de contingencia de 2x2. La significancia estadística se establece mediante el paquete estadístico

Epi Info 7.1.4.0, tomando en cuenta los valores de χ^2 . Los resultados se consideran significativos cuando el valor de p fue <0.05 ; de igual forma se estima 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

Las características clínicas de los sujetos incluidos en ambas etapas se presentan en la tabla 7, la relación de género (F:M) para los participantes de la primera etapa fue de 1:2.1 en el grupo de pacientes y 1:1.8 en el grupo FSE, en la segunda etapa la relación en el grupo EPT fue 1:2.3 y en FSE 1:2.0; en ambas etapas, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. El promedio de edad en los grupos EPT de ambas etapas, fue ligeramente mayor que el grupo FSE (aproximadamente 3 años, $p=NS$). El índice tabáquico fue mayor en el grupo de pacientes en comparación con los fumadores sin la enfermedad. En relación al grado GOLD, en los dos grupos de casos incluidos, la mayor cantidad de sujetos se encontró en los grados II y III (~70%), siendo el de mayor frecuencia GOLD II (primera etapa=44.84%, segunda etapa=41.15%, $p=NS$). Se encontraron diferencias en las medidas de función pulmonar, producto de las características propias de la selección de casos y controles (tabla7).

Tabla 7 Datos demográficos de población incluida

Variables	Primera etapa		Segunda etapa		P	
	EPT n=165	FSE n=165	EPT (n=260)	FSE (n=506)		
Género						
	Masculino (%)	112 (67.87)	107 (64.84)	181 (69.62)	340 (67.19)	NS
	Femenino (%)	53 (32.12)	58 (35.15)	79 (30.38)	166 (32.80)	NS
Edad		63.96 ± 2.92	60.07 ± 4.63	66.8 ± 3.21	63.5 ± 5.02	NS
Índice tabáquico		55.16 ± 4.8	51.87 ± 1.7	52 ± 4.1	48 ± 2.2	NS
Grado GOLD (%)						
	I	27 (16.36)		44 (16.92)		NS
	II	74 (44.84)		104 (41.15)		NS
	III	47 (28.48)		71 (27.30)		NS
	IV	17 (10.30)		38 (14.61)		NS
Medidas de función pulmonar *‡						
	FEV1 ref (%)	58.70 (14-129)	97.54 (58-140)	65 (15-78)	95 (83-160)	<0.001
	FVC ref (%)	85.06 (31-160)	97.53 (61-140)	81 (18-90)	90 (80-156)	<0.001
	FEV1/FVC (%)	51.82 (22-70)	79.88 (71-91)	57 (19-62)	84 (73-108)	<0.001

EPT=Pacientes con EPOC secundaria a tabaquismo; FSE=Fumadores sin la enfermedad; ± SD. * Valores post-broncodilatador. ‡ se muestran valores mínimos y máximos.

9.2 Primera etapa

9.2.1 Conjuntos de alineación en *TNF*

A través de la alineación comparativa de secuencias fue posible determinar 11 diferentes conjuntos de alineación (*contigs*) y se realizó la comparación de sus frecuencias en los grupos de estudio; la frecuencia del *contig* 10 se encontró incrementado en el grupo EPT en relación a FSE ($p=0.0005$, $OR=3.64$, $95\% CI=2.03-6.71$) (tabla 8). Las secuencias de los *contigs* identificados son presentadas en el anexo 2.

Tabla 8 Frecuencias de *contigs* de *TNF*

<i>TNF contig</i>	EPT		FSE		p	OR	IC 95%
	n=165	FC (%)	n=165	FC (%)			
10	57	34.55	21	12.65	5.0E-04	3.64	2.03-6.71
2	22	13.33	23	13.86			
1	21	12.73	28	16.87			
3	21	12.73	22	13.25			
6	18	10.91	28	16.87			
Otros	26	<10	43	<10			

EPT= Pacientes con EPOC secundaria a tabaquismo, FSE= Fumadores sin la enfermedad, FC= frecuencia de “*contig*”, p= valor de p, OR=odds ratio, 95% IC 95%= Intervalos de confianza al 95%. Se muestran sólo *contigs* con frecuencia >10%.

9.2.2 Estratificación por grado GOLD de *contigs* de *TNF*

Se realizó la estratificación del grupo de pacientes con base en la clasificación de gravedad GOLD, se denominó los grados de menor gravedad (GOLD I y II) como “G1” y los grados de mayor gravedad (GOLD III y IV) como “G2”. Cuando se comparó G2 vs. G1, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el *contig* 1, el cual está incrementado en el grupo G2 ($p=0.010$, $OR=3.56$, $95\% CI=1.30-10.33$). Al realizar la comparación entre los grupos G1 y G2 con FSE, el *contig* asociado fue el 10 ($p=0.000017$, $OR=3.82$, $95\% CI=1.99-7.43$; $p=0.0042$, $OR=2.92$, $95\% CI=1.35-6.24$, respectivamente; (tabla 9).

Tabla 9 Frecuencias de *contigs* en *TNF* en estratificación por grado GOLD

<i>TNF</i> contig	G1		G2		FSE		p
	n=101	CF (%)	n=64	CF (%)	n=165	CF %	
10	36	35.6	19	29.7	21	12.7	‡ §
1	8	7.92	15	23.4	22	13.3	†
2	13	12.9	8	12.5	23	13.9	
3	15	14.9	8	12.5	28	16.9	
Otros	29	<10	14	<10	71	<10	

G1=GOLD I+II, G2=GOLD III+IV, EPT= Pacientes con EPOC secundaria a tabaquismo, FSE= Fumadores sin la enfermedad, FC= frecuencia de “*contig*”, ‡=Asociación entre G1 and FSE (p=1.8E-05, OR=3.82, IC 95%=1.99-7.43); §=Asociación entre G2 y FSE (p=4.2E-05, OR=2.92, IC 95%=1.35-6.24); †=Asociación entre G2 and G1 (p=1.0E-02, OR=3.56, IC 95%=1.30-10.33). Se muestran sólo *contigs* con frecuencia >10%.

9.2.3 Determinación de SNP en *TNF* por secuenciación

Se identificaron 6 polimorfismos en la región analizada, la cual incluyó de la base -350 a -1.

En el análisis por genotipo, se encontró una asociación con el genotipo GA de tres de los seis SNP identificados: rs1800629 (p=0.038, OR=2.07, 95% CI=1.04-4.25), rs56036015 (p=0.0082, OR=3.18, 95% CI=1.32-8.46), y rs361525 (p=0.001, OR=4.220, 95% CI=1.71-11.84), mostrando una frecuencia incrementada en EPT en comparación a FSE (tabla 10).

Tabla 10 Frecuencias de genotipos encontradas en *TNF* por secuenciación en la primera etapa (PE) y discriminación alélica en la segunda etapa (SE)

SNP	PE				SE				p		OR		IC 95%	
	EPT		FSE		EPT		FSE		PE	SE	PE	SE	PE	SE
	n=165	FG (%)	n=165	FG (%)	n=260	FG (%)	n=506	FG (%)						
rs1800629														
GG	133	80.60	148	89.70	233	89.6	479	94.74						
GA	30	18.18	16	9.70	27	10.4	25	4.84	3.8E-02	6.00E-03	2.07	2.26	1.04-4.25	1.23-4.15
AA	2	1.22	1	0.60	0		2	0.42						
rs56036015														
GG	142	86.06	157	95.15	230	88.61	482	95.2						
GA	23	13.94	8	4.85	30	11.39	24	4.8	8.2E-03	1.10E-03	3.18	2.54	1.32-8.46	1.40-4.61
AA	0		0		0		0							
rs4987027														
AA	162	98.18	162	98.18	250	96.06	494	97.6						
CA	2	1.21	3	1.82	5	1.97	6	1.2						
CC	1	0.61	0		5	1.97	6	1.2						
rs673														
GG	158	95.76	162	98.18	243	93.46	483	95.38						
GA	7	4.24	3	1.82	17	6.92	23	4.62						
AA	0		0		0		0							
rs361525														
GG	136	82.42	155	93.94	237	91.24	464	91.79						
GA	26	15.76	7	4.24	22	8.37	41	8.01	1.0E-03		4.220		1.71-11.84	
AA	3	1.82	3	1.82	1	0.4	1	0.21						
rs41297589														
TT	145	87.88	147	89.09	247	94.95	494	97.59						
TA	17	10.30	18	10.91	13	5.05	12	2.41						
AA	3	1.82	0		0		0							

PE: Primera etapa; SE: Segunda etapa; EPT= Pacientes con EPOC secundaria a tabaquismo, FSE= Fumadores sin la enfermedad, FG= Frecuencia de genotipo, p= valor de p, OR=odds ratio, 95% IC 95%= Intervalos de confianza al 95%.

9.2.4 Conjuntos de alineación en *IL6*

Por medio del algoritmo de alineación de secuencias, se consiguió determinar 8 *contigs* diferentes; el *contig* 3 se encuentra aumentado en el grupo EPT (17%) en relación a FSE (8%) ($p=0.0194$ OR=2.39 IC95%=1.14-5.23), en la tabla 11 se muestran las frecuencias de los *contigs* determinados. Las secuencias de los *contigs* identificados son presentadas en el anexo 2.

Tabla 11 Frecuencias de *contigs* de *IL6*

<i>IL6 contig</i>	EPT		FSE		p	OR	IC95%
	n=165	FC (%)	n=165	FC (%)			
1	45	27.27	53	32.12			
2	41	24.85	43	26.06			
3	28	16.97	13	7.88	1.94E-02	2.4	1.14-5.23
4	17	10.3	22	13.33			
Otros	34	<10	35	<10			

EPT= Pacientes con EPOC secundaria a tabaquismo, FSE= Fumadores sin la enfermedad, FC= frecuencia de “*contig*”, p= valor de p, OR=odds ratio, 95% IC 95%= Intervalos de confianza al 95%. Se muestran sólo *contigs* con frecuencia >10%.

9.2.5 Estratificación por grado GOLD de *contigs* de *IL6*

Se realizó la comparación de las frecuencias de *contigs* en los grupos G1 vs. G2 y G1 y G2 vs. FSE respectivamente; se encontró diferencia estadísticamente significativa cuando se comparó al grupo de menor gravedad (22%) con el grupo control (8%) ($p=0.0016$, OR=3.39 IC95%=1.51-7.56) (Tabla 12).

Tabla 12 Frecuencias de *contigs* en *IL6* en estratificación por grado GOLD

<i>IL6 contig</i>	G1		G2		FSE		p
	n=101	FC (%)	n=64	FC (%)	n=165	FC (%)	
1	24	23.4	18	28.3	53	32.12	
2	18	18.09	21	32.08	43	26.06	
3	23	22.34	7	11.32	13	7.88	‡
4	13	12.77	5	7.55	22	13.33	
Otros	23	<10	14	<10	35	<10	

G1=GOLD I+II, G2=GOLD III+IV, EPT= Pacientes con EPOC secundaria a tabaquismo, FSE= Fumadores sin la enfermedad, FC= frecuencia de “*contig*”, ‡=Asociación entre G1 vs. FSE (p=1.6E-03, OR=3.39 IC95%=1.51-7.56). Se muestran sólo *contigs* con frecuencia >10%.

9.2.6 Determinación de SNP en *IL6* por secuenciación

Se logró determinar 5 polimorfismos tipo SNP diferentes en la región que comprendió de la base -250 a -1; se encontró asociación en el genotipo GC del rs140838807, al estar aumentada su frecuencia en el grupo de EPT vs. FSE (p=0.0206, OR=1.85, IC 95%=1.09-3.16) y en el caso del genotipo GA del rs1800797, su frecuencia en el grupo de FSE en relación al grupo de casos (p=0.0273, OR=0.60, IC 95%=0.38-0.95) (tabla 13).

Tabla 13 Frecuencias de genotipos encontradas en *IL6* por secuenciación en la primera etapa (PE) y discriminación alélica en la segunda etapa (SE)

SNP	PE				SE				p		OR		IC 95%	
	EPT		FSE		EPT		FSE		PE	SE	PE	SE	PE	SE
	n=165	FG (%)	n=165	FG (%)	n=260	FG (%)	n=506	FG (%)						
rs140838807														
GG	103	0.62	128	0.78										
CG	53	0.32	34	0.20					2.0E-02		1.85		1.09-3.16	
CC	9	0.05	3	0.02										
rs186909159														
AA	102	0.62	117	0.70										
TA	52	0.32	43	0.26										
TT	11	0.06	5	0.04										
rs1800797														
GG	83	0.50	104	0.63	119	46.15	257	50.85	2.7E-02	NS	0.60	NS	0.38-0.95	NS
AG	75	0.45	57	0.35	119	46.15	193	38.23						
AA	7	0.05	4	0.02	22	7.69	56	10.92						
rs1800796														
GG	121	0.74	128	0.76	202	78.63	363	71.67						
CG	24	0.15	32	0.18	58	21.37	143	28.33						
CC	5	0.04	5	0.02	0	0	0	0						
rs192273987														
AA	125	0.76	126	0.76										
AG	32	0.20	35	0.18										
GG	8	0.04	4	0.02										

PE: Primera etapa; SE: Segunda etapa; EPT= Pacientes con EPOC secundaria a tabaquismo, FSE= Fumadores sin la enfermedad, FG= Frecuencia de genotipo, p= valor de p, OR=odds ratio, 95% IC 95%= Intervalos de confianza al 95%.

9.2.7 Conjuntos de alineación en *IL8*

Se realizó la alineación comparativa de las secuencias obtenidas; se obtuvieron 8 contigs diferentes, de los cuales se comparó las frecuencias entre los grupos de estudio, así como en el grupo pacientes estratificado por grado GOLD, no se encontró asociación en ninguna de estas comparaciones, por lo cual no se determinó las frecuencias de los polimorfismos comprendidos en esta región ni se continuó con su análisis en la etapa posterior (tabla 14.)

Tabla 14 Frecuencias de contigs de *IL8*

<i>IL8</i> contig	EPT		FSE		p	OR	IC 95%
	n=165	FC (%)	n=165	FC (%)			
3	67	43.79	66	41.25	NS	NS	NS
5	20	13.07	24	15.00	NS	NS	NS
2	18	11.76	22	13.75	NS	NS	NS
Otros	60	<10	53	<10	NS	NS	NS

EPT= Pacientes con EPOC secundaria a tabaquismo, FSE= Fumadores sin la enfermedad, FC= frecuencia de “contig”, p= valor de p, OR=odds ratio, 95% IC 95%= Intervalos de confianza al 95%. Se muestran sólo *contigs* con frecuencia >10%.

9.3 Segunda etapa

9.3.1 Frecuencias de genotipos en *TNF*

Los seis SNP identificados previamente por secuenciación, fueron genotipificados por PCR en tiempo real y los resultados de sus frecuencias de genotipos comparadas usando la prueba de χ^2 , el genotipo GA del rs1800629 se encontró incrementado en el grupo de pacientes con EPOC (10.4%) comparado con los fumadores sin la enfermedad. En el caso del rs56036015 mostró una frecuencia incrementada en el grupo EPT (11.93%) en relación a FSE (4.8%); en ambos casos, las diferencias fueron estadísticamente significativas y asociadas a un riesgo incrementado (OR>2.0) (tabla 10).

9.3.2 Frecuencias de genotipos en *IL6*

Para esta etapa en *IL6*, se incluyeron aquellos polimorfismos que fueron asociados en la etapa previa (rs140838807 y rs1800797); adicionalmente se genotipificó el rs1800796, debido a que se ha reportado previamente en diferentes trabajos en otras poblaciones, en alto desequilibrio de ligamiento.

En cuanto a los polimorfismos asociados en la etapa previa, sus frecuencias fueron similares en ambas etapas, sin embargo, el hallazgo de asociación no se mantuvo. Con respecto al rs1800796, sus frecuencias de genotipo fueron similares a lo reportado en las bases de datos; sus diferencias no fueron estadísticamente significativas.

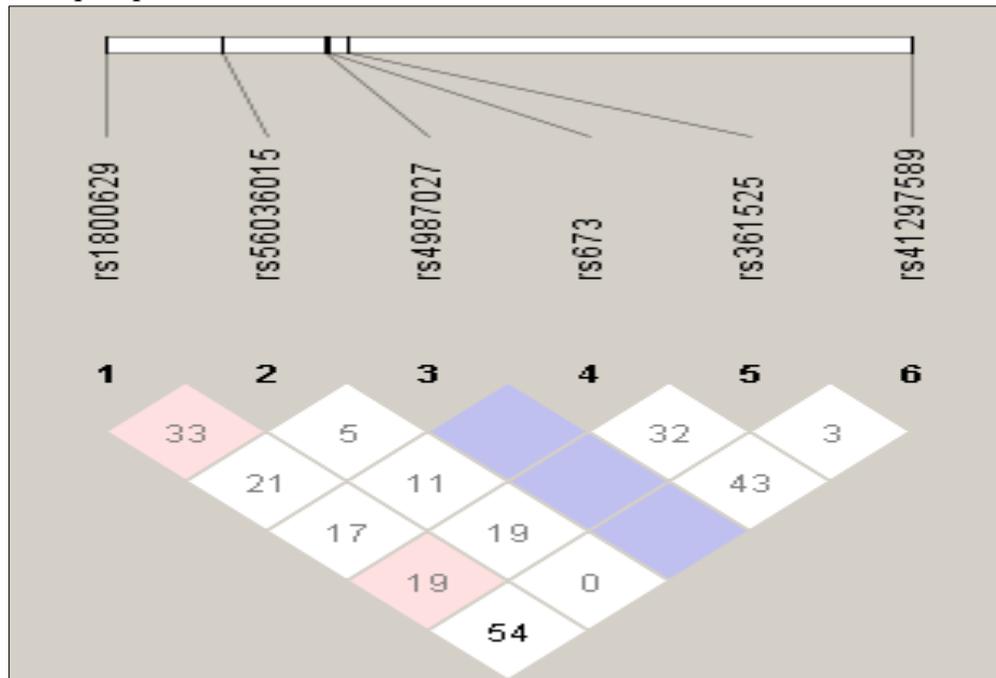
9.3.3 Análisis de haplotipos

Con las frecuencias alélicas obtenidas de la etapa de validación por sondas Taqman, se realizó el análisis empleando el software Haploview v4.2, para el caso de *TNF* no se encontró ningún haplotipo con una $r^2 > 0.80$, para *IL6* se formó 1 haplotipo tomando una $r^2 > 0.80$ (figura 1), el haplotipo fue formado entre el rs140838807 y el rs1800797, los rs1800797-rs1800796 tuvieron una $r^2 = 0.79$ y rs1800796-rs192273987 $r^2 = 0.76$; sin embargo, no se encuentra ningún haplotipo asociado con la enfermedad o con la gravedad GOLD; sólo el rs361525 de *TNF* no se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg (tabla 15).

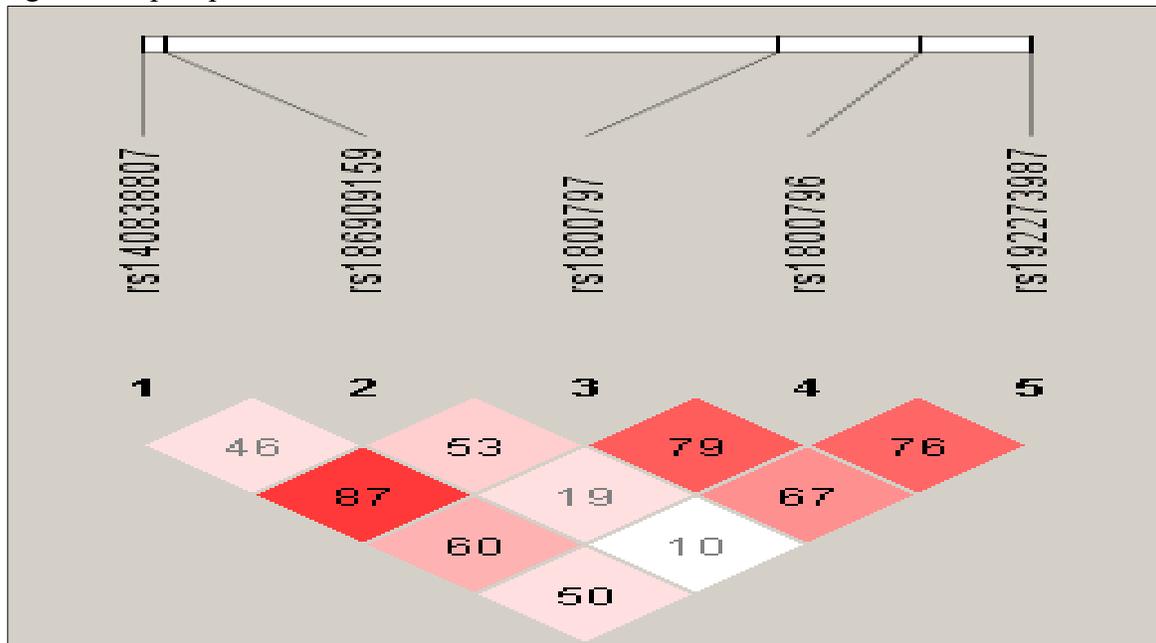
Tabla 15 Equilibrio de Hardy-Wienberg en SNP de *TNF* e *IL6*

Gen	SNP	ObsHET	PredHET	HWpval
<i>TNF</i>	rs1800629	0.14	0.146	0.655
	rs56036015	0.094	0.09	0.953
	rs4987027	0.015	0.021	0.0634
	rs673	0.03	0.03	1
	rs361525	0.1	0.127	0.0038
	rs41297589	0.106	0.117	0.2393
<i>IL6</i>	rs140838807	0.264	0.28	0.3798
	rs186909159	0.289	0.312	0.2411
	rs1800797	0.401	0.362	0.0655
	rs1800796	0.222	0.243	0.1809
	rs192273987	0.207	0.245	0.0131

ObsHET=Heterocigotos observados, PredHET=Heterocigotos predichos, HWpval=Valor de p del equilibrio de Hardy-Weinberg, %Geno=% de genotipificación, MAF=Frecuencia del alelo menor.

Figura 5 Haplotipos en *TNF*

Se incluyeron los 6 SNP analizados en la etapa de validación.

Figura 6 Haplotipos en *IL6*

Se incluyeron los 6 SNP analizados en la etapa de validación.

9.4 Determinación de la expresión de mRNA de TNF- α e IL-6

9.4.1 Expresión de mRNA de TNF- α

La expresión de mRNA fue reportada por el método de $\Delta\Delta\text{CT}$, y normalizada con el valor del control endógeno (GAPDH), se expresan en Unidades Relativas de mRNA y ajustadas a escala logarítmica en la gráfica.

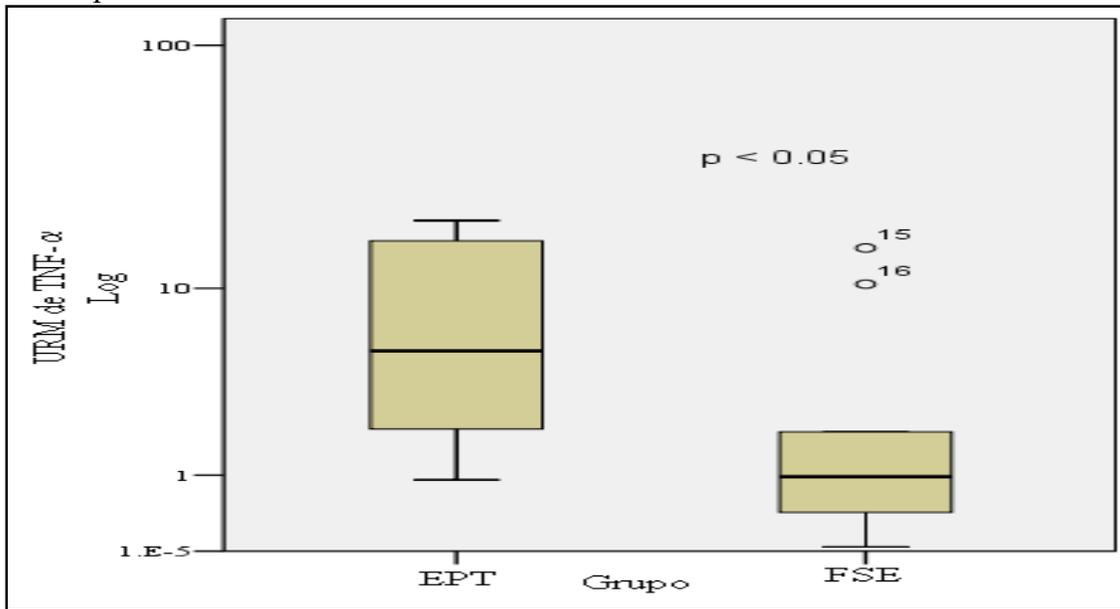
Se encontró que la expresión en pacientes con EPOC fue mayor en comparación con los fumadores sin la enfermedad, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$); dicho incremento es de 2.6 veces más en el grupo EPT en comparación con FSE (figura 3).

9.4.2 Expresión de mRNA de IL-6

El análisis de expresión de IL-6 fue realizado siguiendo el mismo método descrito para TNF- α ; los niveles de expresión encontrados no fueron detectables en ninguno de las muestras

incluidas, por lo cual se decidió realizar la determinación a partir de células de sangre periférica de los mismos individuos, sin embargo, no fue posible detectar tampoco los niveles de esta forma.

Figura 2 Expresión de TNF- α



La expresión de TNF- α aumentó 2.56 veces, al dividir el valor normalizado de EPT entre FSE.

10.0 Discusión

La EPOC es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a lo largo del mundo, particularmente entre fumadores mayores de 40 años de edad. A pesar de la investigación biomédica, esfuerzos en los cuidados de salud y los altos costos de atención, las estadísticas revelan un aumento en la mortalidad (158). Se estima que globalmente, cerca de 6 millones de muertes cada año son atribuibles a fumar, y se prospecta que para 2030 incrementará esta cifra a 8.3 millones, en respuesta a este fenómeno la OMS ha establecido el Convenio Marco para el Control del Tabaco (FCTC, por sus siglas en inglés). Este convenio ha aportado evidencia considerable sobre el hecho de que los impuestos al cigarro, las leyes de espacios libres de humo de cigarro, la publicidad advirtiendo los daños y las campañas y tratamientos para dejar de fumar, pueden reducir tasas de fumadores (159).

La EPOC es una enfermedad pulmonar de origen multifactorial, se han descrito diferentes vías inmunológicas involucradas en su patogénesis (160), también se han reportado diferentes biomarcadores alterados, en particular los relacionados a inflamación, entre estos se encuentra el TNF- α , el cual tiene funciones como mediador en la respuesta inmune frente a bacterias Gram positivas, amplifica la inflamación por medio de la regulación de diferentes genes y se relaciona con efectos sistémicos de la EPOC; existen estudios que han demostrado relación entre trastornos metabólicos y niveles elevados de TNF- α (161), se asocia con metabolismo acelerado, así como con enfermedades crónico debilitantes, resultando en pérdida de peso, de proteínas de músculo esquelético y tejido adiposo (152, 141). El incremento en su producción conduce a aumento de la inflamación y respuesta pro-oxidativa, además se piensa que desempeña un papel importante en las características respiratorias y sistémicas de la enfermedad (47), se han encontrado aumentados estos niveles durante exacerbaciones infecciosas (162), también se ha asociado con manifestaciones sistémicas como disminución del índice de masa corporal (163) y gasto energético anormal en reposo (164).

Dicha citocina se codifica por el gen *TNF*, localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3), a lo largo del gen se han descrito una gran cantidad de polimorfismos; a este respecto, diferentes estudios han evaluado la contribución de polimorfismos tipo SNP en la región promotora, dada su participación en la regulación transcripcional. En el presente trabajo se caracterizaron conjuntos de alineación (*contigs*) en la región promotora de *TNF*, asociados con la susceptibilidad y con la gravedad GOLD en EPOC; además se analizaron de manera individual los polimorfismos contenidos en estos conjuntos, se identificaron tres SNP asociados con el establecimiento de la enfermedad, dos de los cuales se conservaron después de su validación en una segunda población con las mismas características clínicas y poblacionales.

Este es el primer trabajo empleando esta metodología que reporta conjuntos de alineación, que son polimorfismos compartidos por un grupo de individuos, asociados a EPOC. Previamente se han realizado trabajos en los cuales se han encontrado haplotipos asociados con la enfermedad; en 2008 Gingo M. y cols. realizaron un estudio en caucásicos de CO, USA., en donde analizaron 5 SNP en el promotor de *TNF*, encontraron que el alelo A en la posición -308 y A en -237 se asocia con riesgo incrementado, mientras el alelo T en -857 con riesgo disminuido al comparar los grados menos graves *versus* los más graves, interesantemente también encontraron el haplotipo CC/TT (-1031/-863) con un OR disminuido al comparar pacientes con fumadores sin la enfermedad (165). En contraste, en una población de Grecia se analizó un microarreglo con 5 SNP en el promotor de *TNF* en pacientes con EPOC secundaria a tabaquismo y bronquiectasias; no se encontraron asociación con los polimorfismos de manera individual; mientras que con el haplotipo TCCGG (-1013T/C, -863C/A, -857C/T, -308G/A, -238G/A) se observó una asociación discreta al compararlo con un grupo poblacional incluido en el estudio (166). En población caucásica de USA, se realizó un análisis de 10 SNP etiqueta en *TNF* y *LTA*, en el que no encontraron asociación ni de manera individual, ni con algún haplotipo (167), existe evidencia en relación del componente hereditario, a través de diferentes estudios de asociación genética, no obstante, estas asociaciones

se observan de manera diferente en función de la población; en un meta análisis realizado para el SNP -308 G/A en *TNF*, tomando en cuenta 19 estudios diferentes en población asiática, se encuentra asociación con riesgo incrementado y una p acumulada de 0.009, interesantemente al comparar con los estudios en poblaciones caucásicas, no encuentra asociación (143); no existen reportes estratificados por población para polimorfismos en *IL6* asociados con EPOC. En cuanto a la gravedad de la enfermedad y su asociación con variantes genéticas, los hallazgos resultan controversiales; en población caucásica de USA se realizó un estudio donde no se encontraron asociados polimorfismos de *TNF* con la tasa de decline de la función pulmonar (168), consistente con este hallazgo, en población caucásica de Turquía no se encontró asociación del rs1800629 con el pronóstico, determinado por la caída de la FEV1 e índice de masa corporal en el seguimiento de pacientes a un año, sin embargo, el genotipo GA se mostró asociado con exacerbaciones y hospitalización (169). Interesantemente, en caucásicos españoles, el alelo A de *TNF*-863 fue asociado con una mejor FEV1 y un bajo índice BODE (170). Semejante con estos hallazgos en un trabajo realizado en 10 centros diferentes de USA, tomando en cuenta 10 SNP en *LTA* y 4 en *TNF*, no se encontró asociación con las variables de gravedad clínica (166). En el presente trabajo encontramos conjuntos de alineación, asociados con los grados de mayor gravedad GOLD, lo cual constituye el primer reporte de este tipo en población mestiza mexicana. En nuestra población, en cuanto al grado GOLD, la mayor prevalencia se encuentra en GOLD II y III, mientras los de menor frecuencia son I y IV; en este reporte, agrupamos los grados de menor gravedad (GOLD I y II) y los de mayor (III y IV); en los dos grupos de casos incluidos, la mayor cantidad de sujetos se encontró en los grados II y III, siendo el de mayor frecuencia GOLD II, lo cual es un comportamiento reportado en nuestra población (171-172).

De manera individual se identificaron 3 SNP asociados a susceptibilidad, de los cuales el rs1800629 y rs361525 ya han sido estudiados en EPOC, con resultados poco concluyentes; para el SNP *TNF*-308G/A (rs1800629, un cambio de guanina por adenina G→A), se ha reportado que el

alelo A (alelo menor) incrementa la tasa transcripcional del gen, (173) y ha sido asociado a un sinnúmero de enfermedades (174). En una población de Taiwán se reportó asociación con el genotipo GA con bronquitis crónica y con una respuesta inflamatoria incrementada (175), los resultados de este trabajo están incluidos en un meta-análisis realizado por Zang y cols. en 2010, en el cual se mostró que el genotipo -308 GA está asociado al riesgo en poblaciones asiáticas pero no en caucásicas, asociación que se conserva cuando se estratifica por tabaquismo (143), no obstante, estos resultados no han sido replicados en otras poblaciones. En 2012 se realizó un estudio en población taiwanesa, donde se identificó al *TNF*-863 (rs1800630) asociado con incremento en el cociente FEV1/FVC y el índice de masa corporal (144). Otro polimorfismo reportado en EPOC es el rs361525 GA, el cual incrementa la expresión proteica en secreciones pulmonares, así como la bioactividad con inflamación neutrofílica, aumentando su quimiotaxis, además de estar asociado con características clínicas de la enfermedad, incluyendo su progresión (176), este polimorfismo no conservó la asociación al realizar la validación del hallazgo en la segunda etapa; en relación al SNP rs56036015, no existen estudios de asociación con EPOC u otras enfermedades; interesantemente en nuestro estudio dicha asociación se conservó en ambas etapas.

Con respecto a *IL6*, se encontró el contig 3 asociado tanto en el análisis con el grupo de pacientes sin estratificar, así como estratificados por la gravedad clínica de la enfermedad, en este sentido, no se han reportado conjuntos de polimorfismos con EPOC o con algún fenotipo clínico de la enfermedad; Se trata de 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 (75). Las concentraciones de IL-6 se han descrito incrementadas en esputo inducido, lavado bronquioalveolar y concentrado de aire exhalado, particularmente durante exacerbaciones (148-150). La IL-6, también se incrementa en plasma durante las exacerbaciones (151-152). Existe evidencia genética acerca de la participación de ciertos polimorfismos tipo SNP en el gen de *IL6* implicados en el incremento de la producción de

la proteína, así como su asociación con rasgos fenotípicos, tanto de asma como de EPOC; en 2044, se identificó que el polimorfismo 48892 A/C (D358A) en el exón 9 incrementa los niveles séricos de IL-6R, dado que este corresponde a un sitio de ruptura proteolítica, por otro lado el SNP -183 G/A en el promotor mostró una baja concentración del receptor para los portadores del alelo C en comparación con el alelo A (177). En otro estudio, Hawker G. et al, en 2012 reportó en una cohorte de ancestría europea del programa de investigación en asma severa, que el alelo C del rs2228145 de *IL6R* se asocia con un bajo porcentaje de FEV₁, cociente FEV₁/FVC y PC₂₀ (178). Con respecto a polimorfismos en *IL6* asociados con EPOC, en 2009 se reportó que el SNP -174 G/C se asocia con el decline rápido de la función pulmonar, y 4 SNP en alto desequilibrio de ligamiento (-1479 C/T, -1363 G/T, 3331 G/A y 5909 G/A) con la susceptibilidad genética (153). Yanbaeva DG y cols. en el mismo año, demostraron que el haplotipo H2 en *IL6* compuesto por los SNP s2069825, rs2069827, rs1800797, rs2069840, rs1554606, rs2069861 y rs1818879, se asocia con un alto riesgo a padecer EPOC y con bajos niveles de CRP (179). Con respecto a *IL8*, existen diversos polimorfismos que se han asociado con el incremento en la producción de la proteína, así como con EPOC o algún fenotipo clínico, sin embargo, en nuestro trabajo, no encontramos asociación de ningún contig o de polimorfismos individuales, motivo por el cual no se continuó con su análisis en las siguientes etapas (125, 155, 156).

En conjunto, estos polimorfismos de *TNF* e *IL6* no han sido descritos en ningún trabajo previo; en nuestros resultados fue posible reportarlos, dado que la metodología empleada permite encontrarlos a través de un algoritmo de alineación, en el que se comprende a este grupo de variantes polimórficas ubicadas en la región de unión a factores de transcripción. La unión de estos factores, depende en gran medida de las secuencias de nucleótidos y de las variaciones en las mismas, por lo cual el análisis de las regiones reguladoras, es importante para comprender los mecanismos moleculares que están relacionados en la patogénesis de la enfermedad.

En cuanto al análisis de expresión en células pulmonares de esputo inducido, no fue posible detectar niveles de mRNA ni de TNF- α o IL-6; en 2015 Silva Antunes y cols. mostraron que líneas celulares pulmonares bronquiales y alveolares estimuladas con LT $\alpha\beta$, producen citocinas y quimiocinas, entre ellas IL-6 (180). Por otro lado, también demostraron que el rs361525 no induce cambio en los niveles celulares de expresión, medidos a través de ELISA y qPCR (181), sin embargo, en ambos reportes emplearon líneas celulares y células de sangre periférica, en contraste con las obtenidas de esputo inducido de nuestro estudio, dado que es una metodología no invasiva, que permite el acceso a células epiteliales pulmonares, así como células de la respuesta inflamatoria local. Aun así, cuando se realizó el análisis de expresión en células de sangre periférica, se encontró un mayor nivel de expresión del grupo de pacientes con EPOC en comparación con fumadores sin la enfermedad, esto ha sido reportado por diferentes grupos de trabajo, tanto en modelos murinos como en células de sangre periférica humana (182).

11. Conclusiones

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que existen grupos de riesgo al establecimiento de EPOC, así como con la gravedad clínica en función del conjunto de polimorfismos de *TNF* e *IL6*, los cuales se encuentran en la región promotora, y que pueden influir en la producción proteica en este grupo de sujetos, sin embargo esta producción, al ser local, es difícil de cuantificar por medio de la separación de esputo inducido, por lo cual resulta deseable el análisis informático ulterior que relacione las secuencias identificadas, particularmente aquellas asociadas a mayor gravedad, con los potenciales factores de transcripción.

12.0 Literatura citada

1. From the *Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD*, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2014. Available from: <http://www.goldcopd.org/>.
2. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz; Instituto Nacional de Salud Pública; Secretaría de Salud. Encuesta Nacional de Adicciones 2011: Reporte de Tabaco. Reynales-Shigematsu LM, Guerrero-López CM, Lazcano-Ponce E, Villatoro-Velázquez JA, Medina-Mora ME, et al. México DF, México: INPRFM, 2012. Disponible en: www.inprf.gob.mx, www.conadic.gob.mx, www.cenadic.salud.gob.mx, www.insp.mx
3. Roca J, Vargas C, Cano I, et al., the Synergy-COPD consortium. Chronic Obstructive Pulmonary Disease heterogeneity: challenges for health risk assessment, stratification and management. *Journal of Translational Medicine* 2014;12(Suppl 2):S3. PMID:4255905
4. Lee PN, Fry JS. Systematic review of the evidence relating FEV₁ decline to giving up smoking. *BMC Medicine* 2010;8:84. PMID: 3017006
5. Klimentidis YC, Vazquez AI, de Los Campos G, Allison DB, Dransfield MT, Thannickal VJ. Heritability of pulmonary function estimated from pedigree and whole-genome markers. *Front Genet.* 2013 9;4:174.. PubMed PMID: 24058366
6. 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.
7. Caballero A, Torres-Duque CA, Jaramillo C, Bolívar F, Sanabria F, Osorio P, et al. Prevalence of COPD in five Colombian cities situated at low, medium, and high altitude (PREPOCOL study). *Chest.* 2008;133(2):343-9. PubMed PMID: 17951621
8. Menezes AM, Muiño A, López-Varela MV, Valdivia G, Lisboa C, Jardim JR, Montes de Oca M, et al; Equipo del estudio Platino. A population-based cohort study on chronic obstructive pulmonary disease in Latin America: methods and preliminary results. The PLATINO Study Phase II. *Arch Bronconeumol.* 2014;50(1):10-7. PubMed PMID: 24332830.
9. Burkhardt R, Pankow W. The diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Dtsch Arztebl Int.* 2014 5;111(49):834-46. PMID: 25556602
10. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2000 27;343(4):269-80. PMID 10911010.
11. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2004 24;350(26):2645-53. PMID 15215480.
12. Takizawa H, Tanaka M, Takami K, Ohtoshi T, Ito K, Satoh M, et al. 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.
13. Tudor 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. Taraseviciene-Stewart L, Voelkel NF. Molecular pathogenesis of emphysema. *J Clin Invest.* 2008 Feb;118(2):394-402. doi: 10.1172/JCI31811. Review. PubMed PMID: 18246188
15. Sachithanandan A, Badmanaban B. Contemporary surgical management of advanced end stage emphysema: an evidence based review. *Med J Malaysia.* 2012;67(3):253-8. Review. PubMed PMID: 23082412

16. Sahebji H. Emphysema-like changes in HIV. *Ann Intern Med.* 1992 15;116(10):876. PubMed PMID: 1567106.
17. Francus T, Klein RF, Staiano-Coico L, Becker CG, Siskind GW. Effects of tobacco glycoprotein (TGP) on the immune system. II. TGP stimulates the proliferation of human T cells and the differentiation of human B cells into Ig secreting cells. *J Immunol.* 1988 15;140(6):1823-9. PubMed PMID: 3257988.
18. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(3):183-92. Review. PubMed PMID: 18274560.
19. Alberg A. The influence of cigarette smoking on circulating concentrations of antioxidant micronutrients. *Toxicology* 2002; 180: 121–137. PMID 12324189.
20. 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.
21. 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.
22. 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
23. Barrett AJ. The many forms and functions of cellular proteinases. *Fed Proc* 1980; 39:9-14. PMID 6985872.
24. 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.
25. Stockley RA. Neutrophils and the pathogenesis of COPD. *Chest* 2002; 121: 151s–155s. PMID 12010844.
26. Larsson C, Eriksson S, Dirksen H. Smoking and intermediate alpha1-antitrypsin deficiency and lung function in middle-aged men. *Br Med J.* 1977; 2(6092):922-5. PMID 303135.
27. 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.
28. Stoller JK, Snider GL, Brantly ML, Fallat RJ, Stockley RA, Turino GM, 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.
29. Emeo DL, Sandhaus RA, Barker AF, Brantly ML, Eden E, McElvaney NG, et ál. Determinants of airflow obstruction in severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *Thorax.* 2007; 62(9):806-13. PMID 17389752.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.

34. Gaillard MC, Zwi S, Nogueira CM, Ludewick H, Feldman C, Frankel A, 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.
35. Gupta J, Bhadoria DP, Lal MK, Kukreti R, Chattopadhyaya D, Gupta VK, 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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 22;274(4):2234-42. PMID 9890986.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. Goldsby R. A., Kindt T. J., Osborne B A., 2004, *Inmunología, Migración de leucocitos e inflamación*. Ed. Mc Graw Hill. México, pp 284-322. (1231345#)
45. Witkamp R, Monshouwer M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. *Vet Q*. 2000 (1):11-6. Review. PMID: 10682381.
46. Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:127-59. Review. PMID:15771568.
47. Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNF alpha in pulmonary pathophysiology. *Respir Res*. 2006 Oct 11;7:125. Review. PMID: 17034639.
48. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 (9):3666-70. PMID: 1103152.
49. Helson L, Green S, Carswell E, Old LJ. Effect of tumour necrosis factor on cultured human melanoma cells. *Nature*. 1975;258(5537):731-2. PMID: 1207755.

50. Williamson BD, Carswell EA, Rubin BY, Prendergast JS, Old LJ. Human tumor necrosis factor produced by human B-cell lines: synergistic cytotoxic interaction with human interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 (17):5397-401. PMID: 6193516.
51. Li J, Yin Q, Wu H. Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily. *Adv Immunol*. 2013;119:135-53. doi: 10.1016/B978-0-12-407707-2.00005-9. Review. PMID: 23886067.
52. Zhang G. Tumor necrosis factor family ligand-receptor binding. *Curr Opin Struct Biol*. 2004 (2):154-60. Review. PMID: 15093829.
53. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*. 1988;53(1):45-53. PMID: 3349526.
54. Schmitt DA, Sasaki H, Pollard RB, Suzuki F. Antiviral effects of recombinant human tumor necrosis factor-alpha in combination with natural interferon-beta in mice infected with herpes simplex virus type 1. *Antiviral Res*. 1992;19(4):347-52. PMID: 1463323.
55. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, et al. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*. 1984 ;312(5996):724-9. PMID:6392892.
56. Hajeer AH, Dababneh A, Makki RF, Thomson W, Poulton K, González-Gay MA, et al. Different gene loci within the HLA-DR and TNF regions are independently associated with susceptibility and severity in Spanish rheumatoid arthritis patients. *Tissue Antigens*. 2000;55(4):319-25. PMID:10852383.
57. Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res*. 1985;13(17):6361-73. PMID:2995927.
58. Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S, Cerami A. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(6):1670-4. PMID:2419912.
59. Beutler B. Application of transcriptional and posttranscriptional reporter constructs to the analysis of tumor necrosis factor gene regulation. *Am J Med Sci*. 1992;303(2):129-33. Review. PMID:1311496.
60. Kruys V, Beutler B, Huez G. Translational control mediated by UA-rich sequences. *Enzyme*. 1990;44(1-4):193-202. Review. PMID:2133651.
61. Kruys V, Kemmer K, Shakhov A, Jongeneel V, Beutler B. Constitutive activity of the tumor necrosis factor promoter is canceled by the 3' untranslated region in nonmacrophage cell lines; a trans-dominant factor overcomes this suppressive effect. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(2):673-7. PMID:1731340.
62. Fiers W, Beyaert R, Boone E, Cornelis S, Declercq W, Decoster E, et al. TNF-induced intracellular signaling leading to gene induction or to cytotoxicity by necrosis or by apoptosis. *J Inflamm*. 1996;47(1-2):67-75. Review. PMID:8913931.

63. Wong GH, Goeddel DV. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science*. 1988;242(4880):941-4. PMID:3263703.
64. Opipari AW Jr, Hu HM, Yabkowitz R, Dixit VM. The A20 zinc finger protein protects cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *J Biol Chem*. 1992;267(18):12424-7. PMID:1618749.
65. Jäättelä M, Wissing D. Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection. *J Exp Med*. 1993;177(1):231-6. PMID:8418204.
66. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol*. 1997;34(5):391-9. PMID:9293772.
67. Tsai EY, Yie J, Thanos D, Goldfeld AE. Cell-type-specific regulation of the human tumor necrosis factor alpha gene in B cells and T cells by NFATp and ATF-2/JUN. *Mol Cell Biol*. 1996 (10):5232-44. PMID: 8816436.
68. Lee FS, Hagler J, Chen ZJ, Maniatis T. Activation of the I κ B alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell*. 1997;88(2):213-22. PMID: 9008162.
69. Brenner DA, O'Hara M, Angel P, Chojkier M, Karin M. Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha. *Nature*. 1989;337(6208):661-3. PMID: 2537468.
70. Calandra T, Baumgartner JD, Grau GE, Wu MM, Lambert PH, Schellekens J, Verhoef J, Glauser MP. Prognostic values of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1, interferon-alpha, and interferon-gamma in the serum of patients with septic shock. Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. *J Infect Dis*. 1990;161(5):982-7. PMID: 2109023.
71. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol*. 2001;19:163-96. Review. PMID: 11244034.
72. Männel DN, Echtenacher B. TNF in the inflammatory response. *Chem Immunol*. 2000;74:141-61. Review. PMID: 10608086.
73. Taylor PC, Peters AM, Paleolog E, Chapman PT, Elliott MJ, McCloskey R, Feldmann M, Maini RN. Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000;43(1):38-47. PMID: 10643698.
74. Sriram K, O'Callaghan JP. Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2007;2(2):140-53. Review. PMID: 18040839
75. 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.
76. 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.
77. Weissenbach J, Chernajovsky Y, Zeevi M, Shulman L, Soreq H, Nir U, et ál. Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and Escherichia coli cloning studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(12):7152-6. PMID:6164058.

78. Yoshizaki K, Nakagawa T, Kaieda T, Muraguchi A, Yamamura Y, Kishimoto T. Induction of proliferation and Ig production in human B leukemic cells by anti-immunoglobulins and T cell factors. *J Immunol.* 1982;128(3):1296-301. PMID:6799573.
79. Okada M, Sakaguchi N, Yoshimura N, Hara H, Shimizu K, Yoshida N, Yoshizaki K, et al. B cell growth factors and B cell differentiation factor from human T hybridomas. Two distinct kinds of B cell growth factor and their synergism in B cell proliferation. *J Exp Med.* 1983;157(2):583-90. PMID:6600487.
80. Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K, et al. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(16):5490-4. PMID:2410927.
81. Van Damme J, Opdenakker G, Simpson RJ, Rubira MR, Cayphas S, Vink A, et al. Identification of the human 26-kD protein, interferon beta 2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1987;165(3):914-9. PMID:3493322.
82. May LT, Torcia G, Cozzolino F, Ray A, Tatter SB, Santhanam U, Sehgal PB, Stern D. Interleukin-6 gene expression in human endothelial cells: RNA start sites, multiple IL-6 proteins and inhibition of proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;159(3):991-8. PMID:2649105.
83. Santhanam U, Ray A, Sehgal PB. Repression of the interleukin 6 gene promoter by p53 and the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(17):7605-9. PMID:1652755.
84. Savino R, Lahm A, Salvati AL, Ciapponi L, Sporeno E, Altamura S, Paonessa G, et al. Generation of interleukin-6 receptor antagonists by molecular-modeling guided mutagenesis of residues important for gp130 activation. *EMBO J.* 1994;13(6):1357-67. PMID:7511100.
85. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today.* 1990;11(12):443-9. Review. PMID:2127356.
86. Bazan JF. Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold. *Neuron.* 1991;7(2):197-208. PMID:1714745.
87. Epevik T, Waage A, Faxvaag A, Shalaby MR. Regulation of interleukin-2 and interleukin-60 production from T-cells: involvement of interleukin-1 beta and transforming growth factor-beta. *Cell Immunol.* 1990;126(1):47-56. PMID:2302741.
88. Sehgal PB, Helfgott DC, Santhanam U, Tatter SB, Clarick RH, Ghrayeb J, May LT. Regulation of the acute phase and immune responses in viral disease. Enhanced expression of the beta 2-interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6 gene in virus-infected human fibroblasts. *J Exp Med.* 1988;167(6):1951-6. PMID:3133443
89. Jablons DM, Mulé JJ, McIntosh JK, Sehgal PB, May LT, Huang CM, Rosenberg SA, Lotze MT. IL-6/IFN-beta-2 as a circulating hormone. Induction by cytokine administration in humans. *J Immunol.* 1989;142(5):1542-7. PMID:2783945.
90. Jirik FR, Podor TJ, Hirano T, Kishimoto T, Loskutoff DJ, Carson DA, Lotz M. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immunol.* 1989;142(1):144-7. PMID:2783321.
91. Podor TJ, Jirik FR, Loskutoff DJ, Carson DA, Lotz M. Human endothelial cells produce IL-6. Lack of responses to exogenous IL-6. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;557:374-85; discussion 386-7. PMID:2660697.

92. Brown TJ, Rowe JM, Liu JW, Shoyab M. Regulation of IL-6 expression by oncostatin M. *J Immunol.* 1991;147(7):2175-80. PMID: 1918953.
93. Bunning RA, Russell RG, Van Damme J. Independent induction of interleukin 6 and prostaglandin E2 by interleukin 1 in human articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;166(3):1163-70. PMID: 2407240.
94. Luger TA, Schwarz T, Krutmann J, Kirnbauer R, Neuner P, Köck A, et al. Interleukin-6 is produced by epidermal cells and plays an important role in the activation of human T-lymphocytes and natural killer cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;557:405-14. PMID: 2472094.
95. Chiu CP, Moulds C, Coffman RL, Rennick D, Lee F. Multiple biological activities are expressed by a mouse interleukin 6 cDNA clone isolated from bone marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(19):7099-103. PMID: 3262872.
96. Rose-John S, Schooltink H, Lenz D, Hipp E, Dufhues G, Schmitz H, Schiel X, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. Studies on the structure and regulation of the human hepatic interleukin-6 receptor. *Eur J Biochem.* 1990;190(1):79-83. PMID: 2163835.
97. <http://www.ensembl.org/index.html>
98. Yasukawa K, Hirano T, Watanabe Y, Muratani K, Matsuda T, Nakai S, et al. Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *EMBO J.* 1987;6(10):2939-45. PMID: 3500852.
99. Zilberstein A, Ruggieri R, Korn JH, Revel M. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J.* 1986;5(10):2529-37. PMID:3023045.
100. Ray A, LaForge KS, Sehgal PB. On the mechanism for efficient repression of the interleukin-6 promoter by glucocorticoids: enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion. *Mol Cell Biol.* 1990;10(11):5736-46. PMID:2233715.
101. Isshiki H, Akira S, Tanabe O, Nakajima T, Shimamoto T, Hirano T, Kishimoto T. Constitutive and interleukin-1 (IL-1)-inducible factors interact with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene. *Mol Cell Biol.* 1990;10(6):2757-64. PMID: 2111442.
102. Chen-Kiang S, Hsu W, Natkunam Y, Zhang X. Nuclear signaling by interleukin-6. *Curr Opin Immunol.* 1993;5(1):124-8. Review. PMID: 8452668.
103. Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, Yoshida K, Sudo T, Naruto M, Kishimoto T. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell.* 1994;77(1):63-71. PMID: 7512451.
104. Moffatt S, Tanaka N, Tada K, Nose M, Nakamura M, Muraoka O, Hirano T, Sugamura K. A cytotoxic nonstructural protein, NS1, of human parvovirus B19 induces activation of interleukin-6 gene expression. *J Virol.* 1996;70(12):8485-91. PMID: 8970971.
105. Shimizu H, Mitomo K, Watanabe T, Okamoto S, Yamamoto K. Involvement of a NF-kappa B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. *Mol Cell Biol.* 1990;10(2):561-8. PMID:2405250
106. Sancéau J, Kaisho T, Hirano T, Wietzerbin J. Triggering of the human interleukin-6 gene by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in monocytic cells involves cooperation between interferon regulatory factor-1, NF kappa B, and Sp1 transcription factors. *J Biol Chem.* 1995;270(46):27920-31. PMID: 7499267.
107. Hess S, Rensing-Ehl A, Schwabe R, Bufler P, Engelmann H. CD40 function in nonhematopoietic cells. Nuclear factor kappa B mobilization and induction of IL-6 production. *J Immunol.* 1995;155(10):4588-95. PMID: 7594457.

108. Ohsugi Y. Recent advances in immunopathophysiology of interleukin-6: an innovative therapeutic drug, tocilizumab (recombinant humanized anti-human interleukin-6 receptor antibody), unveils the mysterious etiology of immune-mediated inflammatory diseases. *Biol Pharm Bull.* 2007 (11):2001-6. Review. PMID: 17978466.
109. Park JY, Pillinger MH. Interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2007;65 Suppl 1:S4-10. Review. PMID: 17708744.
110. Lotz M, Jirik F, Kabouridis P, Tsoukas C, Hirano T, Kishimoto T, et al. B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J Exp Med.* 1988 1;167(3):1253-8. PMID: 3127525
111. Grossman RM, Krueger J, Yourish D, Granelli-Piperno A, Murphy DP, May LT, Kupper TS, Sehgal PB, Gottlieb AB. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(16):6367-71. PMID: 2474833.
112. Maier R, Ganu V, Lotz M. Interleukin-11, an inducible cytokine in human articular chondrocytes and synoviocytes, stimulates the production of the tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1993;268(29):21527-32. PMID: 8408003.
113. Richards CD, Langdon C, Pennica D, Gauldie J. Murine cardiotrophin-1 stimulates the acute-phase response in rat hepatocytes and H35 hepatoma cells. *J Interferon Cytokine Res.* 1996;16(1):69-75. PMID: 8640454.
114. Walz A, Schmutz P, Mueller C, Schnyder-Candrian S. Regulation and function of the CXC chemokine ENA-78 in monocytes and its role in disease. *J Leukoc Biol.* 1997;62(5):604-11. Review. PMID: 9365115.
115. Yoshimura T, Robinson EA, Appella E, Matsushima K, Showalter SD, Skeel A, Leonard EJ. Three forms of monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) distinguished by different lengths of the amino-terminal sequence. *Mol Immunol.* 1989;26(1):87-93. PMID: 2648135.
116. Schröder JM, Gregory H, Young J, Christophers E. Neutrophil-activating proteins in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 1992;98(2):241-7. PMID: 1732389.
117. Van Damme J, Decock B, Conings R, Lenaerts JP, Opdenakker G, Billiau A. The chemotactic activity for granulocytes produced by virally infected fibroblasts is identical to monocyte-derived interleukin 8. *Eur J Immunol.* 1989;19(7):1189-94. PMID: 2668011.
118. Kownatzki E, Uhrich S, Grüninger G. Functional properties of a novel neutrophil chemotactic factor derived from human monocytes. *Immunobiology.* 1988;177(4-5):352-62. PMID: 2848760.
119. Suzuki G, Sawa H, Kobayashi Y, Nakata Y, Nakagawa Ki, Uzawa A, Sakiyama H, Kakinuma S, Iwabuchi K, Nagashima K. Pertussis toxin-sensitive signal controls the trafficking of thymocytes across the corticomedullary junction in the thymus. *J Immunol.* 1999;162(10):5981-5. PMID: 10229836
120. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:675-705. Review. PMID: 9143704.
118. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, et al. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science.* 1994;266(5189):1395-9. PMID: 7973732.
119. Bachelier F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, et al. International Union of Pharmacology. LXXXIX. Update on the Extended Family of

- Chemokine Receptors and Introducing a New Nomenclature for Atypical Chemokine Receptors. *Pharmacol Rev.* 2013;66(1):1-79. PMID: 24218476.
120. Gimbrone MA Jr, Obin MS, Brock AF, Luis EA, Hass PE, Hébert CA, Yip YK, Leung DW, Lowe DG, Kohr WJ, et al. Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science.* 1989;246(4937):1601-3. PMID: 2688092.
121. Lindley I, Aschauer H, Seifert JM, Lam C, Brunowsky W, Kownatzki E, Thelen M, Peveri P, Dewald B, von Tscherner V, et al. Synthesis and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding monocyte-derived neutrophil-activating factor: biological equivalence between natural and recombinant neutrophil-activating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(23):9199-203. PMID: 3057503.
122. Clark-Lewis I, Kim KS, Rajarathnam K, Gong JH, Dewald B, Moser B, Baggiolini M, Sykes BD. Structure-activity relationships of chemokines. *J Leukoc Biol.* 1995;57(5):703-11. Review. PMID: 7759949.
123. Maione TE, Gray GS, Petro J, Hunt AJ, Donner AL, Bauer SI, Carson HF, Sharpe RJ. Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science.* 1990;247(4938):77-9. PMID: 1688470.
124. Schmid J, Weissmann C. Induction of mRNA for a serine protease and a beta-thromboglobulin-like protein in mitogen-stimulated human leukocytes. *J Immunol.* 1987;139(1):250-6. PMID: 2953813.
125. Jeremy Hull, Hans Ackerman, Kate Isles, Stanley Usen, Margaret Pinder, Anne Thomson, et al. Unusual Haplotypic Structure of IL8, a Susceptibility Locus for a Common Respiratory Virus. *Am J Hum Genet.* 2001; 69(2): 413-419: PMID:11431705.
126. Damiá Ade D, Gimeno JC, Ferrer MJ, Fabregas ML, Folch PA, Paya JM. A study of the effect of proinflammatory cytokines on the epithelial cells of smokers, with or without COPD. *Arch Bronconeumol.* 2011;47(9):447-53. PMID:21676518.
127. Pérez-Padilla R.
127. Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell.* 1986 Aug;46(5):659-67. PMID: 3488815.
128. Ueno A, Murakami K, Yamanouchi K, Watanabe M, Kondo T. Thrombin stimulates production of interleukin-8 in human umbilical vein endothelial cells. *Immunology.* 1996;88(1):76-81. PMID: 8707354
129. Schröder JM, Mrowietz U, Christophers E. Purification and partial biologic characterization of a human lymphocyte-derived peptide with potent neutrophil-stimulating activity. *J Immunol.* 1988;140(10):3534-40. PMID: 3283239.
130. Peveri P, Walz A, Dewald B, Baggiolini M. A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* 1988;167(5):1547-59. PMID: 2835419.
131. Dahinden CA, Kurimoto Y, De Weck AL, Lindley I, Dewald B, Baggiolini M. The neutrophil-activating peptide NAF/NAP-1 induces histamine and leukotriene release by interleukin 3-primed basophils. *J Exp Med.* 1989;170(5):1787-92. PMID: 2478657.
132. Taub DD, Anver M, Oppenheim JJ, Longo DL, Murphy WJ. T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8). IL-8-induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 1996;97(8):1931-41. PMID: 8621778.
133. Tuschil A, Lam C, Haslberger A, Lindley I. Interleukin-8 stimulates calcium transients and promotes epidermal cell proliferation. *J Invest Dermatol.* 1992;99(3):294-8. PMID: 1512465.

134. Ogura M, Takeuchi H, Kawakubo H, Nishi T, Fukuda K, Nakamura R, Takahashi T, Wada N, Saikawa Y, Omori T, Miyasho T, Yamada S, Kitagawa Y. Clinical significance of CXCL-8/CXCR-2 network in esophageal squamous cell carcinoma. *Surgery*. 2013;154(3):512-20. PMID: 23972657.
135. Necchi A, Pennati M, Zaffaroni N, Landoni E, Giannatempo P, Raggi D, Schwartz LH, et al. Analysis of plasma cytokines and angiogenic factors in patients with pretreated urothelial cancer receiving Pazopanib: the role of circulating interleukin-8 to enhance the prognostic accuracy. *Br J Cancer*. 2013. PMID: 24231947.
136. Luo XJ, Mo XR, Zhou LL. The effect of Hsp72 on IL-6, IL-8 expression and activation of NF-kappaB in synoviocytes of rheumatoid arthritis. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2012;28(4):336-9. Chinese. PMID: 23156730.
137. Hogg JC, Senior RM. Chronic obstructive pulmonary disease - part 2: pathology and biochemistry of emphysema. *Thorax*. 2002; 57(9):830-4. PMID 12200530.
138. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest*. 2002 Mar;109(5):571-7. Review. PubMed PMID:11877463
139. Simani AS, Inoue S, Hogg JC. Penetration of the respiratory epithelium of guinea pigs following exposure to cigarette smoke. *Lab Invest*. 1974 Jul;31(1):75-81. PubMed PMID: 4843211.
140. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Acute and chronic inflammation. In: Robbins and Cotran pathological basis of disease. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. pp. 47–86. 1254877
141. 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 (Lond)*. 2010 9;7:29. PubMed PMID:20534161
142. 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.
143. Zhang S, Wang C, Xi B, Li X. Association between the tumour necrosis factor- α -308G/A polymorphism and chronic obstructive pulmonary disease: an update. *Respirology*. 2011;16(1):107-15. PMID: 20946339.
144. Chen YC, Liu SF, Chin CH, Wu CC, Chen CJ, Chang HW, et ál. Association of tumor necrosis factor-alpha-863C/A gene polymorphism with chronic obstructive pulmonary disease. *Lung*. 2010;188(4):339-47. PMID:20352242.
145. Yokoyama A, Kohno N, Sakai K, Kondo K, Hirasawa Y, Hiwada K. Circulating levels of soluble interleukin-6 receptor in patients with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(5):1688-91. PMID:9372694.
146. Tillie-Leblond I, Pugin J, Marquette CH, Lamblin C, Saulnier F, Brichet A, et ál. Balance between proinflammatory cytokines and their inhibitors in bronchial lavage from patients with status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(2):487-94. PMID:9927362.
147. Neveu WA, Allard JL, Raymond DM, Bourassa LM, Burns SM, Bunn JY, et ál. Elevation of IL-6 in the allergic asthmatic airway is independent of inflammation but associates with loss of central airway function. *Respir Res*. 2010 8;11:28. PMID:20205953.
148. 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.
149. 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.

150. 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.
151. Wedzicha JA, Seemungal TA, MacCallum PK, Paul EA, Donaldson GC, Bhowmik A, 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.
152. Debigare R, Marquis K, Cote CH, Tremblay RR, Michaud A, Leblanc P, et ál.. Catabolic-anabolic balance and muscle wasting in patients with COPD. *Chest* 2003; 124:83-89. PMID:12853506.
153. He JQ, Foreman MG, Shumansky K, Zhang X, Akhabir L, Sin DD, et al. Associations of IL6 polymorphisms with lung function decline and COPD. *Thorax*. 2009;64(8):698-704. PMID: 19359268
154. Tadaki H, Arakawa H, Sugiyama M, Ozawa K, Mizuno T, Mochizuki H, et al. Association of cord blood cytokine levels with wheezy infants in the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol*. 2009;20(3):227-33. PMID: 19438981.
155. Yamamoto C, Yoneda T, Yoshikawa M, Fu A, Tokuyama T, Tsukaguchi K, et al.. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest* 1997; 112:505–510. PMID:9266891.
156. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:530–534 PMID:8564092.
157. Pérez-Padilla
158. Hillas G, Perlikos F, Tsiligianni I, Tzanakis N. Managing comorbidities in COPD. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2015;10:95-109. /COPD.S54473. PMID: 4293292
159. Reynales-Shigematsu LM, Fleischer NL, Thrasher JF, Zhang Y, Meza R, Cummings KM, Levy DT. Effects of tobacco control policies on smoking prevalence and tobacco-attributable deaths in Mexico: the SimSmoke model. *Rev Panam Salud Publica*. 2015;38(4):316-25. PMID: 26758223.
160. Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2009 Jun 4;360(23):2445-54. PMID: 19494220.
161. Oudijk EJ, Lammers JW, Koenderman L. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl*. 2003;46:5s-13s. Review. PMID: 14621102.
162. Aaron SD, Angel JB, Lunau M, Wright K, Fex C, Le Saux N, Dales RE. Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(2):349-55. PMID: 11179105.
163. Görek Dilektaşlı A, Ulubay G, Bayraktar N, Eminsoy I, Oner Eyüboğlu F. The effects of cachexia and related components on pulmonary functions in patients with COPD. *Tuberk Toraks*. 2009;57(3):298-305. PubMed PMID: 19787469.
164. Nguyen LT, Bedu M, Caillaud D, Beaufrère B, Beaujon G, Vasson M, et al. Increased resting energy expenditure is related to plasma TNF- α concentration in stable COPD patients. *Clin Nutr*. 1999;18(5):269-74. PMID: 10601533
165. Gingo MR, Silveira LJ, Miller YE, Friedlander AL, Cosgrove GP, Chan ED et al. Tumour necrosis factor gene polymorphisms are associated with COPD. *Eur Respir J*. 2008;31(5):1005-12. PMID: 18256059.

166. Papatheodorou A, Latsi P, Vrettou C, Dimakou A, Chroneou A, Makrythanasis P. Development of a novel microarray methodology for the study of SNPs in the promoter region of the TNF-alpha gene: their association with obstructive pulmonary disease in Greek patients. *Clin Biochem.* 2007;40(12):843-50 PMID:17509552.
167. Tanaka G, Sandford AJ, Burkett K, Connett JE, Anthonisen NR, Paré PD, He JQ. Tumour necrosis factor and lymphotoxin A polymorphisms and lung function in smokers. *Eur Respir J.* 2007 Jan;29(1):34-41. Epub 2006 Sep 13. PubMed PMID:16971410.
168. Sandford AJ, Chagani T, Weir TD, Connett JE, Anthonisen NR, Paré PD. Susceptibility genes for rapid decline of lung function in the lung health study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(2):469-73. PMID: 11179124.
169. Özdoğan N, Tutar N, Demir R, Saatçi Ç, Kanbay A, Büyükoğlan H. Is TNF- α gene polymorphism related to pulmonary functions and prognosis as determined by FEV1, BMI, COPD exacerbation and hospitalization in patients with smoking-related COPD in a Turkish population? *Rev Port Pneumol.* 2014;20(6):305-10. PMID: 24818527.
170. Córdoba-Lanús E, Baz-Dávila R, de-Torres JP, Rodríguez-Pérez MC, Maca-Meyer N, Varo N, et al. TNFA-863 polymorphism is associated with a reduced risk of chronic obstructive pulmonary disease: a replication study. *BMC Med Genet.* 2011 10;12:132. PMID: 21985478
171. Ramírez-Venegas A, Sansores RH, Quintana-Carrillo RH, Velázquez-Uncal M, Hernandez-Zenteno RJ, Sánchez-Romero C, et al FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease associated with biomass exposure. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 1;190(9):996-1002. PMID: 25172140.
172. Camp PG, Ramirez-Venegas A, Sansores RH, Alva LF, McDougall JE, Sin DD, et al. COPD phenotypes in biomass smoke-versus tobacco smoke-exposed Mexican women. *Eur Respir J.* 2014;43(3):725-34 PMID: 24114962.
173. 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 Apr 1;94(7):3195-9. PMID: 9096369; PubMed Central PMCID: PMC20345.
174. Qidwai T, Khan F. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence. *Scand J Immunol.* 2011;74(6):522-47. PMID: 21790707.
175. 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.
176. Sapey E, Wood AM, Ahmad A, Stockley RA. Tumor necrosis factor- α rs361525 polymorphism is associated with increased local production and downstream inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 15;182(2):192-9. PMID: 20299531.
177. Galicia JC, Tai H, Komatsu Y, Shimada Y, Akazawa K, Yoshie H. Polymorphisms in the IL-6 receptor (IL-6R) gene: strong evidence that serum levels of soluble IL-6R are genetically influenced. *Genes Immun.* 2004;5(6):513-6. PMID:15306846.
178. Hawkins GA, Robinson MB, Hastie AT, Li X, Li H, Moore WC, et al. The IL6R variation Asp(358)Ala is a potential modifier of lung function in subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(2):510-5.e1. PMID:22554704.

179. Yanbaeva DG, Dentener MA, Spruit MA, Houwing-Duistermaat JJ, Kotz D, Passos VL, et al. IL6 and CRP haplotypes are associated with COPD risk and systemic inflammation: a case-control study. *BMC Med Genet.* 2009;10:23. PMID:19272152.
180. da Silva Antunes R, Madge L, Soroosh P, Tocker J, Croft M. The TNF Family Molecules LIGHT and Lymphotoxin $\alpha\beta$ Induce a Distinct Steroid-Resistant Inflammatory Phenotype in Human Lung Epithelial Cells. *J Immunol.* 2015 1;195(5):2429-41. PMID: 26209626
181. Gane JM, Stockley RA, Sapey E. The rs361525 polymorphism does not increase production of tumor necrosis factor alpha by monocytes from alpha-1 antitrypsin deficient subjects with chronic obstructive pulmonary disease - a pilot study. *Journal of Negative Results in Biomedicine.* 2015;14:20. PMCID: 4665865.
182. Allais L, Kumar S, Debusschere K, Verschuere S, Maes T, De Smet R, Conickx G, De Vos M, Laukens D, Joos GF, Brusselle GG, Elewaut D, Cuvelier CA, Bracke KR. The Effect of Cigarette Smoke Exposure on the Development of Inflammation in Lungs, Gut and Joints of TNF Δ ARE Mice. *PLoS One.* 2015 2;10(11):e0141570. PMID: 26523550

Anexo 1 Artículo de requisito

Identification of genetic variants in the *TNF* promoter associated with COPD secondary to tobacco smoking and its severity

This article was published in the following Dove Press journal
International Journal of COPD
29 June 2015
Number of views: this article has been viewed

Juan Manuel Reséndiz-Hernández,^{1,2} Raúl H Sansores,³ Rafael de Jesús Hernández-Zenteno,⁴ Gilberto Vargas-Alarcón,⁴ Laura Colín-Baranquá,¹ Mónica Velázquez-Uncal,⁴ Angel Camarena,¹ Alejandra Ramírez-Vanegas,⁵ Ramón Falfán-Valencia¹

¹Laboratory IHLA, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico; ²Graduate Program in Biological Sciences, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; ³Research Department in smoking and COPD, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico; ⁴Department of Molecular Biology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico; ⁵Department of Neurosciences, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlaliscoyotlán de las, Mexico State, Mexico

Correspondence: Alejandra Ramírez-Vanegas
Research Department in smoking and COPD, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Calzada de Tlalcoyotlán 4502, Sección XVI, Tlalcoyotlán, Mexico City 14060, Mexico
Tel +52 55 5467 1700 ext 5221
Email aleriv@iher.com

Ramón Falfán-Valencia
Laboratory IHLA, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Calzada de Tlalcoyotlán 4502, Sección XVI, Tlalcoyotlán, Mexico City 14060, Mexico
Tel +52 55 5467 1700 ext 5152
Fax +52 55 5645 4632
Email rfalfan@iher.gob.mx

Abstract: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is an inflammatory disease that arises in response to noxious particles or gases. Associations of genetic polymorphisms in *TNF* have been reported in Asians and Caucasians, but not in Mestizo populations. A case-control study was conducted in two stages: in the first stage, patients with COPD (COPD group, n=165) and smokers without disease (SNC group, n=165) were included and the *TNF* promoter sequence was determined using direct sequencing. In the second stage, the identified polymorphisms were validated by real-time polymerase chain reaction (PCR) in COPD (n=260) and SNC (n=506). In the first stage, 11 different sets of "contig" alignments were determined, of which contig 10 was found to be associated with susceptibility ($P=5.0E-04$, OR [odds ratio] =3.64) and contig 1 with Global Initiative for COPD (GOLD) greater grade ($P=1.0E-02$, OR =3.82). The single nucleotide polymorphisms found in this region were individually identified; the GA genotypes of rs1800629 ($P=4.03E-03$, OR =2.07), rs56036015 ($P=0.0082$, OR =3.18), and rs361525 ($P=1.0E-02$, OR =4.220) were higher in the COPD group vs the SNC group; after second-stage validation, rs1800629 ($P=6.00E-03$, OR =2.26) and rs56036015 ($P=1.10E-03$, OR =2.54) are maintained. There are genetic variants in the *TNF* promoter associated with increased risk of COPD secondary to smoking and with a higher GOLD grade in the Mexican Mestizo population.

Keywords: lung, cigarette smoking, SNP, GOLD, Mexican population

Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is defined by the Global Initiative for COPD (GOLD) as a common, preventable, and treatable disease characterized by persistent limitation of airflow, which is usually progressive and associated with an increased chronic inflammatory reaction in response to noxious particles or gases in the lung.¹ Cigarette smoking is the main risk factor for developing COPD; however, only 10%–20% of smokers develop the disease, suggesting that other factors influence its development. Some studies estimate that smoking accounts for 15% of the decline in lung function, while genetic factors account for up to 55%.^{2,3} The worldwide prevalence of COPD varies between 5% and 10%, and in Mexico City, it is 7.8%.⁴

COPD is largely related to inflammation, both systemic and localized,⁵ and therefore, various studies have focused on measuring the levels of inflammatory biomarkers and their relation to the clinical severity of the disease.⁶ Some of the markers that have been tested are interleukin 1-beta (IL-1 β), IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). TNF- α is a critical molecule in inflammation regulation because it induces a cascade of other inflammatory cytokines, chemokines, and growth factors.⁷ In addition, murine models have found increased levels of mRNA of TNF- α and some

metalloproteinases in alveolar walls and airways of mice exhibiting overexpression of TNF- α transgene in SP-C producing cells.⁸

Genetic variations in the *TNF* promoter region have been associated with differences in phenotypic expression and with a wide range of infectious, oncological, and autoimmune diseases.^{9–11} Certain studies of the genetic association with COPD reveal some relevance of single nucleotide polymorphisms (SNPs) to *TNF* in Asian populations, but not in Caucasian populations.^{12–14} Therefore, the aim of the present investigation was to determine the set of polymorphisms found in the *TNF* promoter region, its possible associations with COPD secondary to smoking, and the clinical severity in the Mexican Mestizo population.

Material and methods

Study population

A case-control study was performed in two stages; 1,096 participants were included; all were evaluated via lung function tests considering a ratio of forced expiratory volume in 1 second/forced vital capacity (FEV₁/FVC) <70% as COPD; individuals older than 50 years of age and with a smoking rate of ≥ 5 packs/year were included. They underwent a background questionnaire of inherited pathologies, whereby subjects who reported suffering some type of lung and/or chronic inflammatory disease were excluded, as were subjects with non-Mexican ancestry. All participants were recruited from COPD and smoking-cessation support clinics, both belong to Department of Research in Smoking and COPD of Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER) at México City. The subjects were first invited to participate, were asked to sign a letter of informed consent, and then were given a document assuring the privacy of personal data, both evaluated and approved by the Institutional Committee on Science and Bioethics in Research (protocol #B10-12). The STREGA (STrengthening the REporting of Genetic Association) guidelines were taken into consideration in the design of this genetic association study.¹⁵

Stages

In the first stage, 165 patients with a diagnosis of COPD secondary to smoking (COPD group) and 165 smokers without COPD (SNC group) were included. Direct sequencing of the promoter region of the *TNF* gene was performed. In the second stage, validation of the association of the polymorphisms identified in the first step was performed using allelic discrimination via real-time polymerase chain reaction

(RT-PCR); 763 smokers were included, of whom 260 were in the COPD group and 506 in the SNC group.

DNA extraction

The DNA was extracted from peripheral blood cells via venipuncture, using the commercial BDtract Genomic DNA isolation kit (Maxim Biotech, San Francisco, CA, USA). The DNA was then quantified by UV absorption spectrophotometry at the 260 nm wavelength using a NanoDrop system (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Selection and design of the regions to be sequenced

The selected regions of interest were chosen based on previous reports from the available literature, which identifies the regulatory regions in which different transcription factors are found.^{16–18} The region of interest consisted of approximately 300 bp, and the sequence that encompassed this region was selected from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. Using NCBI's Primer-BLAST tool, the primers were designed with GC% <65%, T_m (melting temperature) <60°C, and a primer size of <25 bp. The resultant size of the sequenced region was approximately 350 bp.

Bidirectional sequencing

Sequencing was performed using the commercial BigDye Direct Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), for which the DNA concentration was adjusted to 4 ng/ μ L, and the integrity of the DNA was verified by the electrophoretic shift in a 2% gel. PCR amplification was performed under the following amplification program: 95°C for 10 min for 1 cycle; 96°C for 3 s, 62°C for 15 s, and 68°C for 30 s for 35 cycles; and 72°C for 2 min and 4°C until the next step. The sequencing reaction was performed with the following cycles: 37°C for 15 min, 80°C for 2 min, and 96°C for 1 min for 1 cycle; 96°C for 10 s, 50°C for 5 s, and 60°C for 75 s for 25 cycles, and 4°C until purification. The product obtained was purified via ethanol-EDTA precipitation. The capillary injection was performed in an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using the DT3130POP7{BD} v2.mob mobility file, in the RapidSeq36_POP7_1 analysis module, injecting 1–1.5 kV for 5–10 s, collecting data for 1,800 s, and reviewing them with the Sequencing Analysis Software v5.4 (Applied Biosystems).

Sequence alignment

To identify the sets of alignment, we used the "contig assembly" algorithm in the Sequencher 5.1 (Gene Codes,

Ann Arbor, MI, USA) software, using “assemble automatically” with a “minimum match percentage” of 80 and a “minimum overlap” of 100 bp. The reference sequence was imported from the NCBI database with data obtained from the Ensembl database (Reference Sequence: NC_000006.12), the full sequence is included in Supplementary material, the set of samples that shared a consensus sequence were defined as “contig”. Polymorphisms and their position within the sequence were determined, and all were assigned taking into account the overlap of the peaks in the electropherograms.

Genotyping of the SNPs

The allelic discrimination of SNPs was performed using the commercial TaqMan probes (Applied Biosystems) at a concentration of 20×, using the technique of RT-PCR in a 7300 Real Time PCR System kit (Applied Biosystems), and the analysis was performed by the SDS (sequence detection software) version 1.4 software (Applied Biosystems).

Statistical analysis

The differences between the two groups under study were evaluated by determining and comparing the allele, genotype, and haplotype frequencies. Statistical significance was assessed using the SPSS v15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and Epi Info 7.1.4.0 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA) statistical software, taking into account the χ^2 values. The results were considered significant when the *P*-value was <0.05; similarly, the odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (CIs) were estimated to determine the strength of the association. Correction for

multiple testing was carried out using the Bonferroni (*p*B) adjustment.

Results

The clinical characteristics of the subjects included in both stages are presented in Table 1. The sex ratio (female:male) for the participants in the first stage was 1:2.1 in the patient group and 1:1.8 in the SNC group; in the second stage, the ratio in the COPD group was 1:2.3 and in the SNC group was 1:2.0. In both stages, these differences were not statistically significant. The average age in the COPD groups of both stages was slightly higher than in the SNC group (−3 years, *P*=not significant [NS]). The smoking rate was higher in the patient group compared with the smokers without COPD. For both groups, the largest number of subjects was found in GOLD grades II and III (~70%), with GOLD II being the most frequent (first stage=44.84%, second stage=41.15%, *P*=NS). Differences in the measures of lung function were found due to the specific characteristics of the case and control selection.

First stage analysis

Sets of alignment (contigs)

Through comparative alignment, it was possible to determine 11 different alignment assemblies (contigs), and a comparison of the frequencies of these assemblies between the study groups was performed; contig 10 was increased in the COPD group relative to the SNC group, obtaining a statistically significant difference (*P*=0.0005, OR =3.64, 95% CI =2.03–6.71) (Table 2). The sequences of the different identified contigs are found in Table S1.

Table 1 Demographic and lung function variables

Variables	First stage		Second stage		P-value
	COPD (n=165)	SNC (n=165)	COPD (n=260)	SNC (n=506)	
Sex					
Male (%)	112 (67.87)	107 (64.84)	181 (69.62)	340 (67.19)	NS
Female (%)	53 (32.12)	58 (35.15)	79 (30.38)	166 (32.80)	NS
Age ^a	63.96±2.92	60.07±4.63	66.8±3.21	63.5±5.02	NS
Tobacco index ^a	55.16±4.8	51.87±1.7	52±4.1	48±2.2	NS
GOLD grades (%)					
I	27 (16.36)		44 (16.92)		NS
II	74 (44.84)		104 (41.15)		NS
III	47 (28.48)		71 (27.30)		NS
IV	17 (10.30)		38 (14.61)		NS
Measures of lung function ^{b,c}					
FEV ₁ ref (%)	58.70 (14–129)	97.54 (58–140)	65 (15–78)	95 (83–160)	<0.001
FVC ref (%)	85.06 (31–160)	97.53 (61–140)	81 (18–90)	90 (80–156)	<0.001
FEV ₁ /FVC (%)	51.82 (22–70)	79.88 (71–91)	57 (19–62)	84 (73–108)	<0.001

Notes: ^aMean ± SD; ^bPostbronchodilator values; ^cminimum and maximum values are shown.

Abbreviations: COPD, chronic obstructive pulmonary disease; SNC, smokers without COPD; NS, Not significant; GOLD, Global Initiative for COPD; FEV₁, forced expiratory volume in 1 second; FVC, forced vital capacity; SD, standard deviation.

Table 2 Frequencies of the *TNF* alignment assemblies

<i>TNF</i> contig	COPD		SNC		P-value	OR	95% CI
	n=165	CF (%)	n=165	CF (%)			
10	57	34.55	21	12.65	5.0E-04	3.64	2.03–6.71
2	22	13.33	23	13.86			
1	21	12.73	28	16.87			
3	21	12.73	22	13.25			
6	18	10.91	28	16.87			
Others	26	<10	43	<10			

Note: Only those contigs that had a frequency >10% are shown.

Abbreviations: COPD, chronic obstructive pulmonary disease; SNC, smokers without COPD; CF, "contig" frequency; OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence intervals.

Stratification by GOLD grade

Stratification of the patient group was conducted by GOLD grade, grouping the grades of lesser severity (GI and GII) under the name G1 and the grades of greater severity (GIII and GIV) as G2. When comparing G2 vs G1, a statistically significant difference in contig 1 was obtained, being increased in the greater severity group ($P=0.010$, OR=3.56, 95% CI=1.30–10.33). When comparing the G1 and G2 groups with the SNC group, the associated assembly was 10 ($P=0.000017$, OR=3.82, 95% CI=1.99–7.43; $P=0.0042$, OR=2.92, 95% CI=1.35–6.24, respectively; Table 3).

Determination of SNPs by sequencing

Six SNPs were identified in the studied region, which included the region from base –350 to –1 of the *TNF* promoter. In the analysis by genotype, an association with genotype GA was found for three of the six identified SNPs: rs1800629 ($P=0.038$, OR=2.07, 95% CI=1.04–4.25; $pB=0.228$), rs56036015 ($P=0.0082$, OR=3.18, 95% CI=1.32–8.46; $pB=0.049$), and rs361525 ($P=0.001$, OR=4.220, 95% CI=1.71–11.84; $pB=0.006$), showing increased frequency in COPD compared to the SNC group. In addition, a haplotype analysis was conducted in which all identified polymorphisms were included, none was found to be associated with the disease. The P -value for Hardy–Weinberg

equilibrium (HWE) for each SNP analyzed in sequencing stage is: rs1800629 HWE=0.442, rs56036015 HWE=0.749, rs4987027 HWE=0.906, rs673 HWE=0.906, rs361525 HWE=0.0038, rs41297589 HWE=0.458.

Second stage analysis

Determination of the SNPs by allelic discrimination

Six SNPs, which had previously been identified by sequencing, were genotyped by RT-PCR; the results of the frequency of the genotypes were compared using the χ^2 test and are presented in Table 4.

The GA genotype of rs1800629 was increased in the group of patients with COPD (10.4%) compared with smokers without COPD (4.8%). Also, the GA genotype of rs56036015 had a higher frequency in the COPD group (11.39%) compared with the SNC group (4.8%); in both cases, the differences were statistically significant and were associated with increased risk (OR >2.0). The frequencies of the genotypes for the six SNPs in both stages are presented in Table 4. The characteristics of the identified SNPs are presented in Table 5.

Discussion

COPD is a lung disease of multifactorial origin, and different immunological pathways involved in its pathogenesis have

Table 3 Contig frequencies in the GOLD stratification

<i>TNF</i> contig	G1		G2		SNC		P-value
	n=101	CF (%)	n=64	CF (%)	n=165	CF (%)	
10	36	35.6	19	29.7	21	12.7	1.8E-05 ^a , 4.2E-05 ^b
1	8	7.92	15	23.4	22	13.3	1.0E-02 ^c
2	13	12.9	8	12.5	23	13.9	
3	15	14.9	8	12.5	28	16.9	
Others	29	<10	14	<10	71	<10	

Notes: ^aAssociation between G1 and SNC, OR=3.82, 95% CI=1.99–7.43; ^bassociation between G2 and SNC, OR=2.92, 95% CI=1.35–6.24; ^cassociation between G2 and G1, OR=3.56, 95% CI=1.30–10.33. Only those contigs that had a frequency >10% are shown.

Abbreviations: GOLD, Global Initiative for chronic obstructive pulmonary disease; G1, GOLD I + II; G2, GOLD III + IV; SNC, smokers without COPD; CF, "contig" frequency; OR, odds ratio; CI, confidence intervals.

Table 4 Genotype frequencies of the SNPs identified by sequencing (FS) and allelic discrimination (SS)

SNP	FS				SS				P-value		OR		95% CI	
	COPD		SNC		COPD		SNC		FS	SS	FS	SS	FS	SS
	n=165	GF (%)	n=165	GF (%)	n=260	GF (%)	n=506	GF (%)						
rs1800629														
GG	133	80.60	148	89.70	233	89.6	479	94.74	3.8E-02	6.00E-03	2.07	2.26	1.04–4.25	1.23–4.15
GA	30	18.18	16	9.70	27	10.4	25	4.84						
AA	2	1.22	1	0.60	0		2	0.42						
rs56036015														
GG	142	86.06	157	95.15	230	88.61	482	95.2	8.2E-03	1.10E-03	3.18	2.54	1.32–8.46	1.40–4.61
GA	23	13.94	8	4.85	30	11.39	24	4.8						
AA	0		0		0		0							
rs4987027														
AA	162	98.18	162	98.18	250	96.06	494	97.6						
CA	2	1.21	3	1.82	5	1.97	6	1.2						
CC	1	0.61	0		5	1.97	6	1.2						
rs673														
GG	158	95.76	162	98.18	243	93.46	483	95.38						
GA	7	4.24	3	1.82	17	6.92	23	4.62						
AA	0		0		0		0							
rs361525														
GG	136	82.42	155	93.94	237	91.24	464	91.79	1.0E-03		4.220		1.71–11.84	
GA	26	15.76	7	4.24	22	8.37	41	8.01						
AA	3	1.82	3	1.82	1	0.4	1	0.21						
rs41297589														
TT	145	87.88	147	89.09	247	94.95	494	97.59						
TA	17	10.30	18	10.91	13	5.05	12	2.41						
AA	3	1.82	0		0		0							

Abbreviations: FS, first stage; SS, second stage; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; SNC, smokers without COPD; GF, genotype frequency; OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence intervals.

been described;¹⁹ different altered biomarkers have also been reported, particularly those related to inflammation. Among these is *TNF- α* , which plays a mediator role in the immune response to gram-positive bacteria, amplifies inflammation via the regulation of different genes, and is related to the systemic effects of COPD. Several studies have demonstrated a relationship between metabolic disorders and high levels of *TNF- α* ;²⁰ it is associated with accelerated metabolism and with chronic debilitating diseases, resulting in loss of weight, musculoskeletal proteins, and adipose tissue.^{21,22} Increased *TNF- α* production leads to a raise in the inflammatory and prooxidative responses, and it is also thought to play an important

role in respiratory and systemic disease characteristics.²³ These levels have been found to be increased during infective exacerbations,²⁴ and it has also been associated with systemic manifestations such as decreased body mass index²⁵ and abnormal energy expenditure during rest.²⁶

This cytokine is encoded by the *TNF* gene located on the short arm of chromosome 6 (6p21.3); multiple polymorphisms throughout the gene have been described; in this regard, various studies have evaluated the contribution of SNP-type polymorphisms in the promoter region, given their involvement in transcriptional regulation. In the present study, alignment assemblies (contigs) in the *TNF* promoter region associated with susceptibility and with GOLD severity in COPD were characterized; in addition, polymorphisms contained in these sets were individually analyzed; three SNPs associated with the establishment of the disease were identified, two of which retained the association after validation in a second population with the same clinical and demographic characteristics.

This present study is the first to use this methodology that reports alignment assemblies, which are polymorphisms that are shared by a group of individuals and are associated

Table 5 Localization of SNP identified

SNP	Chr P	Change	NP
rs1800629	31543031	G/A	-308
rs56036015	31543065	G/A	-274
rs4987027	31543094	G/A	-245
rs673	31543095	G/C	-244
rs361525	31543101	G/A	-238
rs41297589	31543262	T/A	-77

Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphisms; Chr P, chromosome position; NP, nucleotide position.

with COPD. Prior work has been performed in which haplotypes associated with the disease have been found; in 2008, Gingo et al²⁷ conducted a study in Caucasians of CO, USA, analyzing five SNPs in the *TNF* promoter and finding that allele A at the -308 position and A at the -237 position are associated with increased risk, whereas allele T at -857 is associated with decreased risk when comparing the less severe grades vs the more severe ones. Interestingly, the researchers also found the haplotype CC/TT (-1031/-863) with a decreased OR when comparing patients against smokers without COPD.²⁷ In contrast, in a Greek population, a microarray was analyzed with five SNPs in the *TNF* promoter in patients with COPD secondary to smoking and bronchiectasis; however, the researchers found no association with individual polymorphisms, whereas with the haplotype TCCGG (-1013T/C, -863C/A, -857C/T, -308G/A, -238G/A), a discrete association was observed when compared with a population group included in the study.²⁸ In a Caucasian population in the USA, an analysis of 10 tag SNPs in *TNF* and *LTA* was performed, and no individual association or association with a certain haplotype was found.²⁹ Regarding the severity of the disease and its association with genetic variants, the findings are controversial; in a US Caucasian population, a study was conducted in which no *TNF* polymorphisms were found associated with the rate of decline in lung function.³⁰ Consistent with this finding, in a Caucasian population in Turkey, no association was found between rs1800629 and the prognosis, as determined by the decrease in FEV₁ and body mass index in the monitoring of patients after 1 year; however, genotype GA showed an association with exacerbations and hospitalization.³¹ Interestingly, in Spanish Caucasians, allele A of *TNF*-863 was associated with an improved FEV₁ and a low-BODE (Body mass index, Obstruction, Dyspnea, Exercise capacity) index.³² Similar to these findings, in a study conducted in ten different centers in the US, considering ten SNPs in *LTA* and four in *TNF*, no association was found with clinical severity variables.²⁹ In this paper, we found alignment assemblies associated with the GOLD grades of the greatest severity, which is the first report of its type in a Mexican Mestizo population. In our population, GOLD II and III had the highest prevalence, whereas the lower frequency grades were I and IV. In this report, we grouped the grades of lesser severity (GOLD I and II) and of greater severity (GOLD III and IV) in the two groups of included cases, with most subjects found in grades II and III. GOLD II was the most frequent, which is a behavior reported in our population.^{33,34}

Individually, three SNPs associated with susceptibility were identified, of which rs1800629 and rs361525 have already been studied in COPD, with inconclusive results. For SNP *TNF*-308G/A (rs1800629, a guanine to adenine [G → A] change), allele A (the minor allele) reportedly increases the rate of gene transcription¹⁰ and has been associated with multiple diseases.³⁵ In a Taiwanese population, an association of the GA genotype with chronic bronchitis and with an increased inflammatory response was reported;¹¹ the results of this work were included in a meta-analysis by Zhang et al³⁶ in which it was shown that the -308 GA genotype is associated with risk in Asian but not in Caucasian populations; this association is preserved when stratified by smoking. However, these results have not been replicated in other populations. In 2012, a study was conducted in a Taiwanese population, in which *TNF*-863 (rs1800630) associated with an increase in the FEV₁/FVC ratio and body mass index was identified.¹³ Another polymorphism reported in COPD is rs361525 GA, which increases the protein expression in lung secretions and bioactivity with neutrophilic inflammation, increasing chemotaxis as well as being associated with clinical features of the disease, including its progression.³⁷ This polymorphism did not retain the association during the validation of the findings in the second stage; our working group previously found a relationship between the GA genotype of this SNP and COPD secondary to biomass-burning smoke, an association that is not maintained when comparing both clinical entities of COPD (Reséndiz-Hernández et al unpublished data, 2015). Regarding SNP rs56036015, there are no association studies regarding COPD or other diseases; interestingly, in our investigation, this association was preserved in both stages.

Together these polymorphisms have not been described in any prior work; in our investigation, it was possible to report them, given that the methodology used enabled finding them using an alignment algorithm, which encompasses this group of polymorphic variants located in the region of transcription factor binding. The binding of these factors depends largely on the nucleotide sequences and on the variations of the same; consequently, the analysis of regulatory regions is important for elucidating the molecular mechanisms that are related to the pathogenesis of the disease.

Among the principal limitations of our study is the difficulty in differentiating the main clinical phenotypes of the disease (chronic bronchitis and emphysema), a fact that may bias the impact of the results, since they affected different biological pathways and molecules involved in these. Regarding our findings, we found that polymorphism rs361525

shows a deviation to HWE, this may be related to the low frequency of the minor allele homozygote (AA) and heterozygous (GA) in Mestizo populations, additionally, rs1800629 does not maintain a significant *P*-value after analysis by multiple testing ($pB=0.228$); however, the rest of genotypes associated conserve the association value ($pB < 0.05$).

It would be worthwhile to perform a subsequent bioinformatic analysis and additional functional studies, which relates the identified sequences, particularly those associated with greater severity, with the potential transcription factors, and identifies their possible correlation with both local (ie, in the lung microenvironment) and systemic expression levels to conclusively determine whether the SNPs identified are associated with COPD development.

Acknowledgments

This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of México (UNAM). JM Reséndiz-Hernández wishes to acknowledge the scholarship (#233765) and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT), and UNAM.

Author contribution

Conception and design, acquisition of data, and analysis and interpretation of data: JMRH, RHS, ARV, and RFV. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content: JMRH, RHS, RJHZ, GVA, LCB, MVU, AC, ARV, and RFV; final approval of the version to be published: JMRH, RHS, RJHZ, GVA, LCB, MVU, AC, ARV, and RFV. Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved: JMRH, RHS, RJHZ, GVA, LCB, MVU, AC, ARV, and RFV. All authors contributed toward data analysis, drafting and revising the paper.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD); 2014. Available from: <http://www.goldcopd.org/>. Accessed June 5, 2015.
- Lee PN, Fry JS. Systematic review of the evidence relating FEV1 decline to giving up smoking. *BMC Med*. 2010;8:84.
- Klimentidis YC, Vazquez AI, de Los Campos G, Allison DB, Dransfield MT, Thannickal VJ. Heritability of pulmonary function estimated from pedigree and whole-genome markers. *Front Genet*. 2013; 4:174.
- Montes de Oca M, Halbert RJ, Talamo C, et al. PLATINO team. Paid employment in subjects with and without chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities: the PLATINO study. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011;15(9):1259–1264.
- Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, et al. Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(1):6–14.
- Sin DD, Vestbo J. Biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6(6):543–545.
- Wouters EF, Reynaert NL, Dentener MA, Vermeij JH. Systemic and local inflammation in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: is there a connection? *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6(8):638–647.
- Eurlings IM, Dentener MA, Mercken EM, et al. A comparative study of matrix remodeling in chronic models for COPD; mechanistic insights into the role of TNF- α . *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;307(7):L557–L565.
- Han MK, Agustí A, Calverley PM, et al. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: the future of COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(5):598–604.
- 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):3195–3199.
- Wu WS, McClain KL. DNA polymorphisms and mutations of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter in Langerhans cell histiocytosis (LCH). *J Interferon Cytokine Res*. 1997;17(10): 631–635.
- Huang SL, Su CH, Chang SC. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(5): 1436–1439.
- Chen YC, Liu SF, Chin CH, et al. Association of tumor necrosis factor-alpha-863C/A gene polymorphism with chronic obstructive pulmonary disease. *Lung*. 2010;188(4):339–347.
- 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):574–580.
- Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, et al. Strengthening the Reporting of Genetic Association Studies (STREGA): an extension of the STROBE statement. *PLoS Med*. 2009;6(2):e22.
- Tsai EY, Yie J, Thanos D, Goldfeld AE. Cell-type-specific regulation of the human tumor necrosis factor alpha gene in B cells and T cells by NFATp and ATF-2/JUN. *Mol Cell Biol*. 1996;16(10):5232–5244.
- Lee FS, Hagler J, Chen ZJ, Maniatis T. Activation of the I κ B kinase complex by MEK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell*. 1997;88(2):213–222.
- Brenner DA, O'Hara M, Angel P, Chojkier M, Karin M. Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha. *Nature*. 1989;337(6208):661–663.
- Cosío MG, Sietta M, Agustí A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2009;360(23):2445–2454.
- Oudijk EJ, Lammers JW, Koenderman L. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2003; 46:5s–13s.
- Debigaré R, Marquis K, Côté CH, et al. Catabolic/anabolic balance and muscle wasting in patients with COPD. *Chest*. 2003;124(1):83–89.
- 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 (Lond)*. 2010;7:29.
- Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. *Respir Res*. 2006;7:125.
- Aaron SD, Angel JB, Lunau M, et al. Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(2):349–355.
- Görek Dilektaşlı A, Ulubay G, Bayraktar N, Eminsoy I, Oner Eyüboğlu F. The effects of cachexia and related components on pulmonary functions in patients with COPD. *Tuberk Toraks*. 2009;57(3):298–305.

26. Nguyen LT, Bedu M, Caillaud D, et al. Increased resting energy expenditure is related to plasma TNF-alpha concentration in stable COPD patients. *Clin Nutr.* 1999;18(5):269-274.
27. Gingo MR, Silveira LJ, Miller YE, et al. Tumour necrosis factor gene polymorphisms are associated with COPD. *Eur Respir J.* 2008; 31(5):1005-1012.
28. Papatheodorou A, Latsi P, Vrettou C, et al. Development of a novel microarray methodology for the study of SNPs in the promoter region of the TNF-alpha gene: their association with obstructive pulmonary disease in Greek patients. *Clin Biochem.* 2007;40(12):843-850.
29. Tanaka G, Sandford AJ, Burkett K, et al. Tumour necrosis factor and lymphotoxin A polymorphisms and lung function in smokers. *Eur Respir J.* 2007;29(1):34-41.
30. Sandford AJ, Chagani T, Weir TD, Connell JE, Anthonisen NR, Paré PD. Susceptibility genes for rapid decline of lung function in the lung health study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(2):469-473.
31. Ozdoğan N, Tutar N, Demir R, Saatçi C, Kanbay A, Büyükoğlan H. Is TNF- α gene polymorphism related to pulmonary functions and prognosis as determined by FEV1, BMI, COPD exacerbation and hospitalization in patients with smoking-related COPD in a Turkish population? *Rev Port Pneumol.* 2014;20(6):305-310.
32. Córdoba-Lamús E, Baz-Dávila R, de-Torres JP, et al. TNFA-863 polymorphism is associated with a reduced risk of chronic obstructive pulmonary disease: a replication study. *BMC Med Genet.* 2011;12:132.
33. Ramírez-Venegas A, Sansores RH, Quintana-Carrillo RH, et al. FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease associated with biomass exposure. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014; 190(9):996-1002.
34. Camp PG, Ramírez-Venegas A, Sansores RH, et al. COPD phenotypes in biomass smoke-versus tobacco smoke-exposed Mexican women. *Eur Respir J.* 2014;43(3):725-734.
35. Qidwai T, Khan F. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence. *Scand J Immunol.* 2011;74(6):522-547.
36. Zhang S, Wang C, Xi B, Li X. Association between the tumour necrosis factor- α -308G/A polymorphism and chronic obstructive pulmonary disease: an update. *Respirology.* 2011;16(1):107-115.
37. Sapay E, Wood AM, Ahmad A, Stockley RA. Tumor necrosis factor- α rs361525 polymorphism is associated with increased local production and downstream inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(2):192-199.

Anexo 2 Secuencias**Secuencias consenso de contigs en *TNF*****Perfil 1**

GAAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATGGGGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTC
 CTACACACGAATCAGTCAGTGGCCAGAAAGACCCCCCTCGGAATCGGAGCAGGGAG
 GATGGGGAGTGTGAGGGGTATCCTTGATGCTTGTGTGTCCCAACTTTCCAAATCCC
 CGCCCCGCGATGGAGAAGAAACCGAGACAGAAGGTGCAGGGCCCACTACCGCTTC
 CTCCAGATGAGCTCATGGGTTTCTCCAGGAAGGAAGTTTTCCGCTGGTTGAATGATT
 CTTTCCCGCCT

Perfil 2

GAAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATGGGGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTC
 CTACACACAAATCAGTCAGTGGCCAGAAAGACCCCCCTCGGAATAGGATGGGGAG
 TGTGAGGGGTATCCTTGATGCTTGTGTGTCCCAACTTTCCAAATCCCCGCCCCGCG
 ATGGAGAAGAAAACCGAGACAGAAGGTGCAGGGGCCCACTACCGCTTCTCCAGAT
 GAGCTCATGGGTTTCTCCACCAAGGAAGTTTTCCGCTGGTTGAATGATTCTTCCCCG
 CCTCCTCTCGT

Perfil 3

GAAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATGGGGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTC
 CTACACACAAATCAAGTCAGTGGGCGAGAAGACCCCCCTCGCAATCGGGAGAAGGG
 AGGAAGGGGAGTGTGAGGGGTATCCTTGATGCTTGGGGGGCCCAATTTCCATCCCC
 CCGCCCCGAGGTGGAGAAAAAACCGAGAAAAAAGAAGGAGCGCCCACTACCGCTT
 CCTCCACAAGAGCTCATGGGTTTCTCCACCAAGGAAGTTTTCCGCTGGTTGAATGATT
 CTTTCCCCGCCCTCCTCTCGT

Perfil 4

GAAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATGGGGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTC
 CTACACACAAATCAGTCAGTGGCCAGAAAGACCCCCCTCGGAATCGGAGCAGGGAG
 GATGGGGAGTGTGAGGGGTATCCTTGATGCTTGTGTGTCCCAACTTTCCAAATCCC
 CGCCCCGCGATGGAGAAGAAACCGAGACAGAAGGTGCAGGGCCCACTACCGCTTC
 CTCCAGATGAGCTCATGGGTTTCTCCACCAAGGAAGTTTTCCGCTGGTTGAATGATT
 TTTCCCCGCCCTCCTCTCGCCCCAGGGACATATAAAGGCAGTTGTTGGCACACCCAG
 CCAGCAGACG

Perfil 5

GAAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATTGGGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTC
 CTACACACAAATCAGTCAGTGGCCAGAAAGACCCCCCTCGGAATCGGAGCAGGGAG
 GATGGGGAGTGTGAGGGGTATCCTTGATGCTTGTGTGTCCCAACTTTCCAAATCCC
 CGCCCCGCGTTGGAGAAGAAACCGAGACAGAAGGTGCAGGGCCCACTACCGCTTC
 CTCCA GATGAGCTCA TGGGTTTCTC CACCAGGAAG TTTTCGCTG

Perfil 6

GAAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATGGGGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTC
 CTACACACAAATCAGTCAGTGGCCAGAAAGACCCCCCTCGGAATCGGAGCAGGGAG
 GATGGGGAGTGTGAGGGGTATCCTTGATGCTTGTGTGTCCCAACTTTCCAAATCCC
 CGCCCCGCGATGGAGAAGAAACCGAGACAGAAGGTGCAGGGCCCACTACCGCTTC
 CTCCAGATGAGCTCATGGGTTTCTCCACCAAGGAAGTTTTCCGCTGGTTGAATGATT

TTTCCCCGCCCTCCTCTCGCCCCAGGGACATATAAAGGCAGTTGTTGGCACACCCAG
CCAGCAGACG

Perfil 7

GAAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATGGGGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTC
CTACACACAAATCAGTCAGTGGCCCAGAAGACCCCCCTCGGAATCGGAGCAGGGAG
GATGGGGAGTGTGAGGGGTATCCTTGATGCTTGTGTGTCCCCAACTTTCCAAATCCC
CGCCCCGCGATGGAGAAGAAACCGAGACAGAAGGTGCAGGGCCCACTACCGCTTC
CTCCAGATGAGCTCATGGGTTTTCTCCACCAAGGAAGTTTTCCGCTGGTTGAATGATT
TTTCCCCGCCCTCCTCTCGCCCCAGGGACATATAAAGGCAGTTGTTGGCACACCCAG
CCAGCAGACG

Perfil 8

GAAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATGGGGACTCTGTTTCAGCCTCCAGGGTCC
TACACACAAATCAGTCAGTGGCCCAGAAGACCCCCCTCGGAATCGGAGCAGGGAGG
ATGGGGAGTGTGAGGGGTATCCTTGATGCTTGTGTGTCCCCAACTTTCCAAATCCCC
GCCCCGCGATGGAGAAGAAACCGAGACAGAAGGTGCAGGGCCCACTACCGCTTCC
TCCAGATGAGCTCATGGGTTTTCTCCACCAAGGAAGTTTTCCGCTGGTTGAATGATTCT
TTCCCCGCCCTCCTCTCGCCCCAGGGACATATAAAGGCAGTTGTTGGCACACCCAGC
CAGCAGACG

Perfil 9

GAAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATTGTGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTCC
TACACACAAATCAGTCAGTGGCCCAGAAGACCCCCCTCGGAATCGGAGCAGGGAGG
ATGGGGAGTGTGAGGGGTATCCTTGATGCTTGTGTGTGCGCCAACCTTTCCAAATCCCC
GCCCCGCGTTGGAGAAGAAACCGAGACAGAAGGTGCAGGGCCCACTACCGCTTCC
TCCA GATGAGCTCA TGGGTTTCTC CACCAGCAAG TTTTCGCTG

Perfil 10

GAAATGGAGGCAATAAGTTTTGAGGGGCATGGGGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTC
CTACACACAAATCAGTCAGTGGCCCAGAAGACCCCCCTCGGAATAGGATGGGGAG
TGTGAGGGGTATCCTTCATGCTTGTGTGACCCCAACTTTCCAAATCCCCGCCCCGCG
ATGGAGAAGAAAACCGAGACAGAAGGTGCAGGGCCCACTACCGCTTCCCTCCAGAT
GAGCTCATGGGTTTTCTCCACCAAGGAAGTTTTCCGCTGGTTGAATGATTCTTTCCCCG
CCCTCCTCTCGT

Perfil 11

GAAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATGGGGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTC
CTACACACAAATAAGTCAGTGGCCCAGAAGACCCCCCTCGGAATCGGAGCAGGGAG
GATGGGGAGTGTGAGGGGTATCCTTGATGCTTGTGTGTCCCCAAGTTTCCAAATCCC
CGCCCCGCGATGGAGAAGAAACCGAGACAGAAGGTGCAGGGCCCACTACCGCTTC
CTCCAGATGAGCTCATTGGGTTTTCTCCACCAAGGAAGTTTTCCGCTGGTTGAATGATT
CTTTCCCCGCCCTCCTCTCGCCCCAGGGACATATAAAGGCAGTTGTTGGCACACCCA
GCAAGCAGACG

Secuencias consenso de contigs en *IL6***Perfil 1**

CAGCCAACCTCCTCTAAGTGGGCTGAAGCAGGTGAAGAAAGTGGCAGAAGCCACGC
 GGTGGCAAAAAGGAGTCACACACTCCACCTGGAGACGCCTTGAAGTAACTGCACGA
 AATTTGAGGATGGCCAGGCAGTTCTACAACAGCCGCTCACAGGGAGAGCCAGAACA
 CAGAAGAACTCAGATGACTGGTAGTATTACCTTCTTCATAATCCCAGGCTTGGGGGG
 CTGCGATGGAGTCAGAGGAAACTCAGTTCAGAACATCTTTGGTTTTTACAAATACAA
 ATTAAGTGAACGCTAAATTCTAGCCTGTTAATCTGGTCACTGAAAAAAAAATTTTTTT
 TTTTTCAAAAACATAGCTTTAGCTTATTTTTTTTTCTCTTTGTAAACTTCGTGCATGA
 CTTAGCTTTACTCTTTGTCAAGACATGCCAAAGTGCTGAGTCACTAATAAAAGAAA
 AAAAGAAAGTAAAGGAAGAGTGGTTCTGCTTCTTAGCGCTAGCCTCAATGACGACCT
 AAGCTGCACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTGCCATGCTAAAGGACGTCACATTGCACA
 ATCTTAATAAGGTTTCCAATCAGCCCCACCCGCTCTGGCCCCACCCTCACCTCCAAC
 AAAGATTTATCAAATGTGGGATTTTCCCATGAGTCTCA

Perfil 2

CAGCCAACCTCCACTAAGTGGGCTGAAGCAGGTGAAGAAAGTGGCAGAAGCCACGC
 GGTGGCAAAAAGGAGTGACACACTCCACCTGGAGACGCCTTGAAGTAACTGCACGA
 AATTTGAGGATGGCCAGGCAGTTCTACAACAGCCGCTCACAGGGAGAGCCAGAACA
 CAGAAGAACTCAGATGACTGGTAGTATTACCTTCTTCATAATCCCAGGCTTGGGGGG
 CTGCGATGGAGTCAGAGGAAATTCAGTTCAGAACATCTTTGGTTTTTACAAATACAA
 ATTAAGTGGTACGCTAAATTCTAGCCTGTTAATCTGGTCACTGAAAAAAAAATTTTTTT
 TTTTTCAAAAACATAGCTTTAGCTTATTTTTTTTTCTCTTTGTAAACTTCGTGCATGA
 CTTAGCTTTACTCTTTGTCAAGACATGCCAAAGTGCTGAGTCACTAATAAAAGAAA
 AAAAGAAAGAAAAGGAAGAGTGGTTCTGCTTCTTAGCGCTAGCCTCAATGACGACC
 TAAGCTGCACTTTTCCCCCTGGTTGTGTCTTGCCATGCTAAAGGACGTCACATTGCAC
 AATCTTAATAAGGTTTCCAATCAGCCCCACCCGCTCTGGCCCCACCCTCACCTCCAA
 CAAAGATTTATCAAATGTGGGATTTTCCCATGAGTCTCA

Perfil 3

CAGCCAACCTACTCTAAGTGGGCTGAAGCAGGTGAAGAAAGTGGCAGAAGCCACGC
 GGTGGCAAAAAGGAGTCACACACTCCACCTGGAGACGCCTTGAAGTAACTGCACGA
 AATTTGAGGATGGCCAGGCAGTTCTACAACAGCCGCTCACAGGGAGAGCCAGAACA
 CAGAAGAACTCAGATGACTGGTAGTATTACCTTCTTCATAATCCCAGGCTTGGGGGG
 CTGCGTTGGAGTCAGAGGAAACTCAGTTCAGAACATCTTTGGTTTTTACAAATACAA
 GTTAAGTGAACGCTAAATTCTAGCCTGTTAATCTGGTCACTGAAAAAAAAATTTTTTT
 TTTTTCAAAAACATAGCTTTAGCTTATTTTTTTTTCTCTTTGTAAACTTCGTGCATGA
 CTTAGCTTTACTCTTTGTCAAGACATGCCAAAGTGCTGAGTCACTAATAAAAGAAC
 AAAAGAAAGTAAAGGAAGAGTGGTTCTGGTTCTTAGCGCTAGCCTCAATGACGACCT
 AAGCTGCACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTGCCATGCTAAAGGACGTCACATTGCACT
 ATCTTAATAAGGTTTCCAATCAGCCCCACCCGCTCTGGCCCCACCCTCACCTCCAAC
 AAAGATTTATCAAATGTGGGATTTTCCCATGAGTCTCA

Perfil 4

CAGCCAACCTCCTCTAAGTGGGCTGAAGCAGGTGAAGAAAGTGGCAGAAGCCACGC
 GGTGGCAAAAAGGAGTCACACACTCCACCTGGAGACGCCTTGAAGTAACTGCACGA

AATTTGAGGATGGCCAGGTAGTTCTACAACAGCCGCTCACAGGGAGAGCCAGAACA
 CAGAAGAACTCAGATGACTCGTAGTATTACCTTCTTCATAATCCCAGGCTTGGGGGG
 CTGCGATGGAGTCAGAGGAACTCAGTTCAGAACATCTTTGGTTTTTACAAATACAA
 ATTAAGTGAACGCTAAATTCTAGCCTGTTAATCTGGTCACTGAAAAAAAAATTTTTTT
 TTTTTCAAAAACATAGCTCTAGCTTATTTTTTTTTCTCTTTGTAAAACCTTCGTGCATGA
 CTTACAGCTTTACTCTTTGTCAAGACATGCCAAAGTGCTGAGTCACTAATAAAAAGAAA
 AAAAGAAAGTAAAGGAAGAGTGGTTCTGCTTCTTAGCGCTAGCCTCAATGACGACCT
 AAGCTGCACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTGCCATGCTAAAGGACGTCACATTGCACA
 ATCTTAATAAGGTTTCCAACAGCCCCACCCGCTCTGGCCCCACCCTCACCTCCAAC
 AAAGATTTATCAAATGTGGCATTTCATGAGTCTCA

Perfil 5

CAGCCAACCTCCTCTAAGTGGGCTGAAGCAGGTGAAGAAAGTGGCAGAAGCCACGC
 GGTGGCAAAAAGGAGTCACACACTCCACCTGGAGACGCCTTGAAGTAACTGCACGA
 AATTTGAGGATGGCCAGGCAGTTCTACAACAGCCGCTCACAGGGAGAGCCAGAACA
 CAGAAGAACTCAGATGACTGGTAGTATTACCTTCTTCATAATCCCAGGCTTGGGGGG
 CTGCGATGGAGTCAGAGGAACTCAGTTCAGAACATCTTTGGTTTTTACAAATACAA
 ATTAAGTGAACGCTAAATTCTAGCCTGTTAATCTGGTCACTGAAAAAAAAATTTTTTT
 TTTTTCAAAAACATAGCTTTAGCTTATTTTTTTTTCTCTTTGTAAAACCTTCGTGCATGA
 CTTACAGCTTTACTCTTTGTCAAGACATGCCAAAGTGCTGAGTCACTAATAAAAAGAAA
 AAAAGAAAGTAAAGGAAGAGTGGTTCTGCTTCTTAGCGCTAGCCTCAATGACGACCT
 AAGCTGCACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTGCCATGCTAAAGGACGTCACATTGCACA
 ATCTTAATAAGGTTTCCAATCAGCCCCACCCGCTCTGGCCCCACCCTCACCTCCAAC
 AAAGATTTATCAAATGTGGGATTTCATGAGTCTCA

Perfil 6

CAGCCAACCTCCTCTAAGTGGGCTGAAGCAGGTGAAGAAAGTGGCAGAAGCCACGC
 GGTAGCAAAAAGGAGTCACACACTCCACCTGGAGACGCCTTGAAGTAACTGCACGA
 AATTTGAGGATGGCCAGGCAGTTCTACAACAGCCGCTCACAGGGAGAGCCAGAACA
 CAGACGAACTCAGATGACTGGTAGTATTACCTTCTTCATAATCCCAGGCTTGGGGGG
 CTGCGATGGAGTCAGAGGAACTCAGTTCAGAACATCTTTGGTTTTTACAAATACAA
 ATTAAGTGAACGCTAAATTCTAGCCTGTTAATCTGGTCACTGAAAAAAAAATTTTTTT
 TTTTTCAAAAACATAGCTTTAGCTTATTTTTTTTTCTCTTTGTAAAACCTTCGTGCATGA
 CTTACCTTTACTCTTTGTCAAGACATGCCAAAGTGCTGAGTCACTAATAAAAAGAAA
 AAAAGAAAGTAAAGGAAGAGTGGTTCTGCTTCTTAGCGCTAGCCTCAATGTCGACCT
 AAGCTGCACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTGCCATCCTAAAGGACGTCACATTGCACA
 ATCTTAATAAGGTTTCCAATCAGCCCCACCCGCTCTGGCCCCACCCTCACCTCCAAC
 AAAGATTTATCAAATGTGGGATTTCATGAGTCTCA

Perfil 7

CAGCCAACCTCCTATAAGTGGGCTGAAGCAGGTGAAGAAAGTGGCAGAAGCCACGC
 GGTGGCAAAAAGGAGTCACACACTCCACCTGGAGCCGCCTTGAAGTAACTGCACGA
 AATTTGAGGATGGCCAGGCAGTTCTACAACAGCCGCTCACAGGGAGAGCCAGAACA
 CAGAAGAACTCAGATGAATGGTAGTATTACCTTCTTCATAATCCCAGGCTTGGGGGG
 CTGCGATGGAGTCAGAGGAACTCAGTTCAGAACATCTTTGGTTTTTACAAATACAA
 ATTAAGTGAACGCTAAATTCTAGCCTGTTAATCTGGTCACTGAAAAAAAAATTTTTTT
 TTTTTCAAAAACATAGCTTTAGCTTATTTATTTTTCTCTTTGTAAAACCTTCGTGCATGA

CTTCAGCTTTACTCTTTGTCAAGACATGCCAAAGTGCTGAGTCACTAATAAAAAGAAA
AAAAGAAAGTAAAGGAAGAGTGGTTCTGCTTCTTAGCGCTATCCTCAATGACGACCT
AAGCTGCACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTGCCATGCTAAAGGACGTCACATTGCACA
ATCTTAATAAGGTTTCCAATCAGCCCCACCAGCTCTGGCCCCACCCTCACCCCTCCAAC
AAAGATTTATCAAATGTGGGATTTTCCCATGAGTCTCA

Perfil 8

CAGCCAACCTCCTCTAAGTGGGCTGAAGCAGGTGAAGAAAGTGGCAGAAGCCACGC
GGCGGCAAAAAGGAGTCGCACACTCCACCTGGAGACGCCTTGAAGTAACTGCACGA
AATTTGAGGATGGCCAGGCAGTTCTACAACAGCCGCTCACAGGGAGAGCCAGAACA
CAGAAGAACTCAGATGACTGGTAGTATTACCTTCTTCATAATCCCAGGCTTGGGGGG
CTGCGAAGGAGTCAGAGGAAACTCAGTTCAGAACATCTTTGGTTTTTACAAATACAA
ATTAAGTGAACGCTAAATTCTAGCCTGTTAATCTGGTCACTGAAAAAAAAATTTGTTT
TTTTTCAAAAACATAGCTTTAGCTTATTTATTTTCTCTTTGTAAAACCTTCGTGCATGA
CTTCAGCTTTACTCTTTGTCAAGACATGCCAAAGTGCTGAGTCACTAATAAAAAGAAA
AAAAGAAAGTAAAGGAAGAGTGGTTCTGCTTCTTAGCGCTAGCCTCAATGACGACCT
AAGCTGCACTTTTCCCCCTAGTAGTGTCTTGCCATGCTAAAGGACGTCACATTGCACA
ATCTTAATAAGGTTTCCAATCAGCCCCACCCGCTCTGGCCCCACCCTCACCCCTCCAAC
AAAGATTTATCAACTGTGGGATTTTCCCATGAGTCTCA