



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Asociación de los polimorfismos TNF α -238 (G/A) y
TNF α -308 (G/A) con la enfermedad pulmonar
obstructiva crónica (EPOC) como posibles
biomarcadores de riesgo en una muestra de
población mexicana**

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGO

presenta

LUIS ÁNGEL SALGADO GARCÍA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. JULIETA RUBIO LIGHTBOURN

Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



El presente trabajo fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a los proyectos con los números IN21011, IN208314 y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) al proyecto número 178860. Se llevó a cabo en el laboratorio C-242 del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. Julieta Rubio Lightbourn y la asesoría de la Dra. Ollin Celeste Martínez Perez.

Agradecemos a la Dra. Alejandra Ramírez Venegas y a la Lic. En enfermería Leticia Ochoa Coutiño, de la clínica de tabaquismo y EPOC del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER) por las facilidades otorgadas para la realización del trabajo. Así mismo, agradecemos a todos los individuos donadores de muestras sanguíneas que se analizaron en el estudio ya que sin su colaboración no habría sido posible este trabajo.

Contenido

Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
-Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.....	9
-Estadios de la EPOC.....	12
-Epidemiología.....	12
-Factores de riesgo para el desarrollo de la EPOC	14
-Factores ambientales	14
-Factores genéticos	16
-Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α).....	17
-Polimorfismos genéticos de TNF α	21
Antecedentes	23
Justificación	27
Objetivos	28
-Objetivo general.....	28
-Objetivos particulares	28
Materiales y método	29
-Determinación del tamaño de muestra.....	29
-Población de estudio	30
-Toma de muestras de sangre.....	31
-Extracción y cuantificación de DNA	32
-Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a polimorfismos de longitud de fragmento de restricción (PCR-RFLP).....	33
-Reacción de digestión enzimática.....	37
-Análisis estadístico	39
Resultados	40
-Características de la población	40
-Asociación del tabaquismo y exposición al humo de leña con la EPOC respecto al sexo	42
-Determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento. ..	44

-Asociación del polimorfismo TNF α -238 con la EPOC.	45
-Asociación del polimorfismo TNF α -308 con la EPOC.	50
Discusión	56
Conclusiones	62
Referencias	63

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de la EPOC en estadios de acuerdo a la GOLD	12
Tabla 2. Defunciones totales por principales causas de mortalidad en México en individuos mayores de 60 años	14
Tabla 3. Principales proteínas relacionadas con la EPOC o rasgos fenotípicos de la enfermedad	17
Tabla 4. Asociación del polimorfismo TNF α -238 con la EPOC analizada en diferentes poblaciones.....	26
Tabla 5. Asociación del polimorfismo TNF α -308 con la EPOC analizada en diferentes poblaciones.....	26
Tabla 6. Criterios de inclusión y exclusión para el grupo de casos.....	30
Tabla 7. Criterios de inclusión y exclusión para el grupo de controles.....	31
Tabla 8. Oligonucleótidos y condiciones de PCR.....	34
Tabla 9. Secuencia teórica de nucleótidos de dos fragmentos amplificados de DNA por técnica de PCR que incluyen los sitios polimórficos TNF α - 238 Y TNF α -308.	35
Tabla 10. Enzimas de restricción empleadas y patrones de digestión observados para la genotipificación de los polimorfismos TNF α -238 y TNF α -308.	38
Tabla 11. Datos epidemiológicos del grupo de casos y del grupo de controles	40
Tabla 12. Asociación del tabaquismo con la EPOC respecto al sexo	42
Tabla 13. Asociación de la exposición al humo de leña y la EPOC respecto al sexo	43
Tabla 14. Determinación del desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos -238 (G/A) y -308 (G/A) del gen de TNF α	44
Tabla 15. Frecuencias genotípicas y alélicas de TNF α -238 del grupo de casos contra el grupo de controles.....	45
Tabla 16. Asociación de las frecuencias del polimorfismo TNF α -238 respecto a los intervalos de edad entre los grupos de casos y controles.....	46
Tabla 17. Asociación de las frecuencias del polimorfismo TNF α -238 respecto al sexo entre los grupos de casos y controles.....	47

Tabla 18. Asociación de las frecuencias del polimorfismo TNF α -238 respecto al hábito tabáquico entre los grupos de casos y controles.....	48
Tabla 19. Asociación de las frecuencias del polimorfismo TNF α -238 respecto a la exposición a humo de leña entre los grupos de casos y controles.....	49
Tabla 20. Frecuencias genóticas y alélicas de TNF α -308 del grupo de casos contra el grupo de controles.....	50
Tabla 21. Asociación de las frecuencias del polimorfismo TNF α -308 respecto a los intervalos de edad entre los grupos de casos y controles.....	51
Tabla 22. Asociación de las frecuencias del polimorfismo TNF α -308 respecto al sexo entre los grupos de casos y controles.....	52
Tabla 23. Asociación de las frecuencias del polimorfismo TNF α -308 respecto al hábito tabáquico entre los grupos de casos y controles.....	53
Tabla 24. Asociación de las frecuencias del polimorfismo TNF α -308 respecto a la exposición a humo de leña entre los grupos de casos y controles.....	54
Tabla 25. Asociaciones significativas de los polimorfismos TNF α -238 y -308 con las variables epidemiológicas. Modelo codominante.....	55

Índice de figuras

Figura 1. Patogenia característica de la bronquitis crónica	10
Figura 2. Patogenia característica del enfisema pulmonar	11
Figura 3. Evolución de la función pulmonar según la edad, hábito tabáquico y susceptibilidad.....	15
Figura 4. Estructura proteínica del factor de necrosis tumoral α	18
Figura 5. Relación del humo de tabaco con el proceso inflamatorio y el desarrollo de bronquitis crónica y enfisema pulmonar	20
Figura 6. Ubicación genética del gen de TNF α y localización de los polimorfismos TNF α -238 y TNF α -308	21
Figura 7. Efecto biológico del polimorfismo de TNF α -308	22
Figura 8. Productos de PCR que amplifican una parte de la región promotora del gen codificante para TNF α que incluye el sitio -238 y -308.....	36
Figura 9. Productos de PCR sometidos a digestión enzimática para la identificación de los polimorfismos TNF α -238 y TNF α -308 con las enzimas de restricción MspI y NcoI respectivamente.....	38

Resumen

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se caracteriza por un proceso inflamatorio anormal e irreversible en la vía respiratoria. Ésta es de origen multifactorial y el tabaquismo es el principal factor asociado con la enfermedad, no obstante, no todos los individuos fumadores desarrollan la EPOC. Por lo tanto se propone que factores genéticos pueden estar involucrados en el desarrollo de la enfermedad. Dentro de éstos, el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) es un mediador de la respuesta inflamatoria, los cambios que ocurren en los sitios -238 (G/A) y -308 (G/A) de la región promotora de su gen se han asociado con alteraciones en la actividad transcripcional y dichos polimorfismos han sido asociados con la EPOC en diferentes poblaciones. El objetivo del estudio fue determinar la asociación de los polimorfismos $TNF\alpha$ -238 y $TNF\alpha$ -308 con la EPOC en una muestra de población mexicana.

Se realizó un estudio epidemiológico de casos y controles integrado por 75 muestras de individuos con EPOC y 75 muestras de individuos sin diagnóstico de EPOC, se registraron las variables de edad, sexo, tabaquismo y exposición al humo de leña. Se obtuvieron muestras de sangre por el método de punción venosa y se extrajo el DNA por el método de gradiente de sacarosa. Se realizó la técnica de PCR-RFLP para la genotipificación de los polimorfismos $TNF\alpha$ -238 y $TNF\alpha$ -308 y para el análisis estadístico se aplicaron las pruebas de T-student, χ^2 y razón de momios utilizando los programas SPSS y Graphpad prism.

Se encontró una asociación de no riesgo entre el polimorfismo $TNF\alpha$ -238 y la EPOC con una OR=0.2810 (IC=0.096-0.8191) y una $p=0.0149$, al estratificar a la población respecto a las variables epidemiológicas, la asociación se mantuvo en el sexo femenino, individuos fumadores y rango de edad de los 60 a los 94 años. Por otro lado, se encontró una asociación de riesgo entre el polimorfismo $TNF\alpha$ -308 y la EPOC con una OR=3.430 (IC=1.268-9.276) y una $p=0.0114$, esta asociación se mantuvo en el sexo masculino, individuos no fumadores, individuos no expuestos al humo de leña y rango de edad de los 61 a los 94 años. Se sugiere que la presencia de ambos polimorfismos alteran la susceptibilidad individual para el desarrollo de la EPOC en la muestra de individuos de población mexicana utilizada en este estudio y se propone confirmar los resultados aquí mostrados con un tamaño de muestra mayor.

Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by an abnormal and irreversible inflammatory process in the airway. This is a multifactorial origin disease and smoking is the main factor associated with the disease, however, not all smokers develop COPD. Then, it is proposed that genetic factors be involved in the disease development. Within these, the tumor necrosis factor alpha (TNF α) is one mediator of the inflammatory response. The changes occurring at sites -238 (G / a) and -308 (G / a) in the promoter region of the TNF α gene have been associated with alterations in transcriptional activity and in the literature, these polymorphisms have been associated with COPD in different populations. The objective of this study was to determine the association of the TNF α -238 and -308 polymorphisms with COPD in a sample of Mexican population.

An epidemiological case-control study was made, integrating 75 samples of COPD patients and 75 samples from individuals without a diagnosis of COPD, the variables of age, sex, smoking and exposure to biomass smoke were collected. Blood samples were obtained by venous puncture method and DNA was extracted by the sucrose gradient method. PCR-RFLP technique was performed for genotyping TNF α -238 and TNF α -308 polymorphisms and for the statistical analysis T-student, χ^2 and odds ratio tests were applied using the SPSS and Graphpad prism programs.

No risk association between TNF α -238 polymorphism and COPD was found determined by an OR = 0.2810 (CI = 0.096 to .8191) and $p = 0.0149$, to stratify the population about the epidemiological variables, the association it remained in female sex, smokers and age range of 60 to 94 years. On the other hand, an association of risk between the TNF α -308 polymorphism and COPD was found determined by an OR = 3.430 (CI = 1268-9276) and $p = 0.0114$, the association it remained in male sex, individuals non-smoking, individuals not exposed to biomass smoke and age range of 61 to 94 years. It is suggested that the presence of TNF α -238 and -308 polymorphisms alter individual susceptibility to develop COPD in the sample of individuals of Mexican population used in this study and it was proposed to confirm the results shown here with a higher sample size.

Introducción

-Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) es una patología prevenible y tratable. Está caracterizada por una limitación al flujo aéreo persistente, generalmente progresiva y sólo parcialmente reversible, asociada a una respuesta inflamatoria acentuada y crónica de las vías respiratorias y del parénquima pulmonar. La enfermedad incluye los síntomas de disnea, tos y expectoración crónicas, con episodios de exacerbación frecuentes de estos síntomas, presentándose con mayor frecuencia en personas mayores de 45 años (GOLD, 2014).

De acuerdo con la Sociedad Americana del Tórax (ATS por sus siglas en inglés), los cuadros de bronquitis crónica y enfisema pulmonar son las dos patologías de la EPOC por lo que los pacientes que la presentan desarrollan alguno de estos padecimientos o incluso una combinación de ambos (ATS, 1995).

La bronquitis crónica se define como una enfermedad caracterizada por la presencia de tos por un periodo mínimo de tres meses al año durante dos o más años consecutivos, esto cuando se excluyen otras causas de tos crónica productiva tales como tuberculosis pulmonar, neumopatía crónica, bronquiectasias, etc. En este padecimiento, como se observa en la **figura 1**, la obstrucción de las vías respiratorias se produce debido a la inflamación y secreción de grandes cantidades de moco por parte de los bronquios, lo que deriva en su estrechamiento (por lo que el interior de las vías respiratorias es más pequeño de lo normal) y la mayor dificultad para expulsar el exceso de mucosidad, presentándose los problemas para respirar (ATS, 1986).

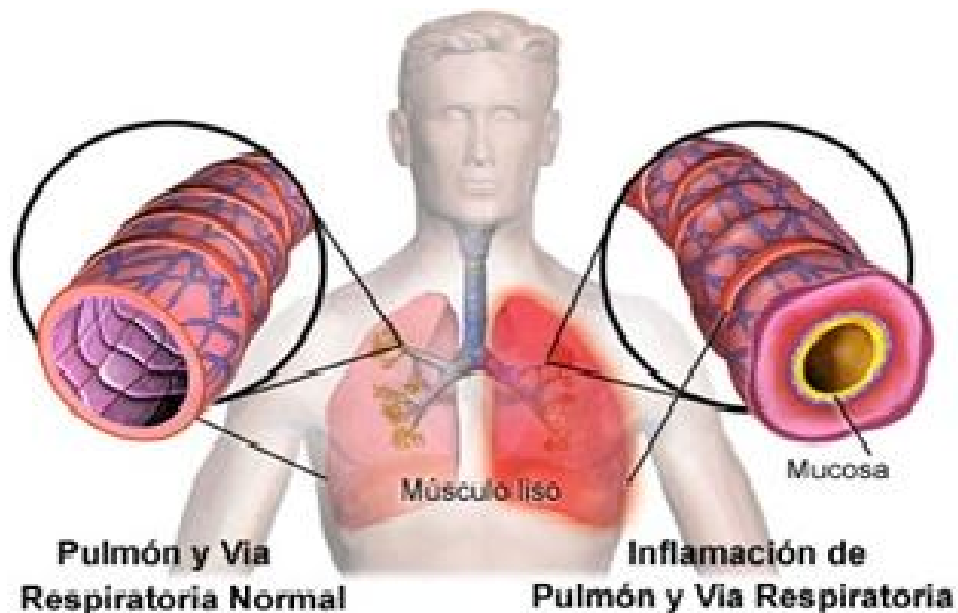


Figura 1. Patogenia característica de la bronquitis crónica. Tomado de <http://www.lookfordiagnosis.com>

El enfisema pulmonar, en cambio, se define como una enfermedad caracterizada por el crecimiento anormal de los espacios aéreos distales y bronquiolos terminales con destrucción de sus paredes. Este padecimiento, como se observa en la **figura 2**, conlleva un daño en las paredes alveolares del pulmón, a medida que avanza la enfermedad, dichas paredes se rompen, por tanto, los alvéolos pierden elasticidad y se crea un espacio más grande en lugar de los espacios pequeños, provocando que quede aire atrapado. Como es difícil expulsar todo el aire que entra a los pulmones, éstos no se vacían de forma eficaz y, por lo tanto, contienen más aire de lo normal. La combinación de tener constantemente aire adicional en los pulmones y el mayor esfuerzo necesario para respirar causa la sensación de falta de aire. La obstrucción de las vías aéreas se da porque los alvéolos que en general ayudan a las vías aéreas a abrirse, no pueden hacerlo durante la inhalación o exhalación, por falta de elasticidad o por su destrucción. Por último, los alvéolos también se inflaman generando obstrucción de vías respiratorias y dificultad para respirar (ATS, 1986).

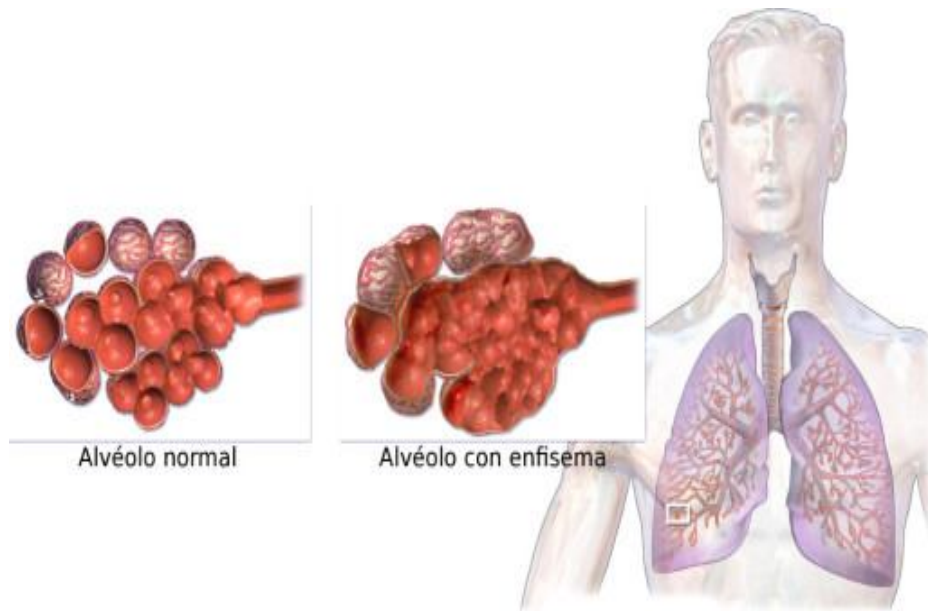


Figura 2. Patogenia característica del enfisema pulmonar. Tomado de <http://enfisema.net>

A medida que la enfermedad y el daño estructural avanzan y se establecen, el proceso inflamatorio que se produce y que caracteriza a la EPOC es más difícil de inhibir (Scanlon *et al.*, 2000), lo que da como consecuencias una inflamación crónica, disfunción endotelial, el engrosamiento de la pared bronquial (obstrucción al flujo aéreo), aumento de especies reactivas del oxígeno (ROS) que conlleva a un desequilibrio del estado redox, el colapso respiratorio del árbol bronquial, la pérdida del retroceso elástico, la destrucción de los espacios aéreos, así como estados de hipoxia e hipercapnia, los cuales progresan hasta la muerte (ALAT, 2011).

Junto con los efectos locales que se producen durante el desarrollo de EPOC (en el lugar de contacto donde se está produciendo el daño, en este caso, el pulmón), los individuos enfermos también suelen presentar evidencias de inflamación sistémica (aumento de citocinas, quimiocinas, proteínas de fase aguda y cambios en el número de células en sangre circulante como neutrófilos, monocitos y linfocitos) (Barnes y Celli, 2009). Por otro lado, con frecuencia la enfermedad se asocia a otros fenómenos sistémicos como la pérdida de peso y/o masa muscular, osteoporosis, enfermedad cardiovascular, depresión, anemia y diabetes mellitus tipo 2 (Agustí, 2005). No obstante, no se ha encontrado una relación entre la inflamación sistémica y los efectos extra-pulmonares asociados a EPOC.

-Estadios de la EPOC

En la actualidad, para realizar el diagnóstico de EPOC se lleva a cabo una evaluación espirométrica, que es la prueba de función pulmonar utilizada de manera universal cuando el paciente presenta síntomas asociados a la enfermedad para poder determinar si existe una anomalía obstructiva, para ello se realizan las siguientes mediciones: Capacidad vital forzada (FVC), es el volumen máximo de aire que se puede espirar en una maniobra espiratoria de esfuerzo máximo, expresado en litros. Volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV_1), es el volumen máximo de aire que se espira en el primer segundo de una espiración máxima (maniobra de FVC) (García *et al.*, 2013). En este sentido, la Iniciativa Global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (GOLD) establece como criterios de diagnóstico de EPOC la relación $FEV_1/FVC < 70\%$, con la cual el individuo es catalogado dentro de la enfermedad, mientras que la medida del FEV_1 funciona para clasificar a los individuos dentro de los estadios o niveles de la enfermedad (Sanchiz *et al.*, 1989 y AARC, 1996). Dicha clasificación se muestra en la **tabla 1**.

Tabla 1. Clasificación de la EPOC en estadios de acuerdo a la GOLD. GOLD, 2014.

Estadio	FEV_1 (% del valor teórico)	FEV_1/FVC
0: en riesgo*	Espirometría normal	≥ 0.7
I: EPOC leve	> 80	< 0.7
II: EPOC moderada	50 – 80	< 0.7
III: EPOC grave	30 – 50	< 0.7
IV: EPOC muy grave	< 30	< 0.7

*Se incluyen pacientes fumadores con exposición ambiental y síntomas como tos o disnea.

-Epidemiología

La EPOC es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en adultos mayores, especialmente en países del tercer mundo (Decramer *et al.*, 2012), Esta enfermedad representa un fuerte impacto socio-económico y constituye un problema de salud pública de primer orden a nivel mundial; de acuerdo a los datos

reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 1990 ocupaba el sexto lugar de mortalidad a nivel mundial, actualmente ocupa la cuarta posición, mientras que para el año 2020, se predice que ésta se convertirá en la tercera causa de mortalidad (Murray y López, 1997, Pauwels *et al.*, 2004, WHO, 2008 y ALAT, 2011). Así mismo, en el año 2012 la OMS menciona que existen 210 millones de personas en el mundo que padecen EPOC, con un número estimado de muertes de 3.28 millones al año, representando el 5.8% del total de muertes.

En el caso de México, el estudio PLATINO (Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción Pulmonar) en el año 2006 reporta una prevalencia de la enfermedad del 7.8% en personas mayores de 40 años de edad. Sin embargo, de acuerdo a estudios publicados anteriormente, se ha descrito una prevalencia de subdiagnóstico de la enfermedad en varios países que varía en el rango de entre 3.2% y 12% (Mannino *et al.*, 2002, Lundback *et al.*, 2003 y Fukuchi *et al.*, 2004). Los resultados publicados por este mismo estudio (PLATINO, 2006) revelan que en la ciudad de México existe una prevalencia del 6.9%, este mismo estudio sugiere que el subdiagnóstico de la enfermedad se da por los siguientes factores: la presencia de síntomas frecuentes de la EPOC, como la disnea y la tos que conducen a realizar diagnósticos médicos incorrectos al confundirla con otros padecimientos pulmonares, el escaso conocimiento que la mayoría de los pacientes tienen sobre la enfermedad y la falta de atención que los propios pacientes tienen sobre los síntomas durante las fases tempranas de la enfermedad.

De acuerdo a las estadísticas que reporta el INEGI, en el año 2005 la EPOC se ubicaba en el lugar 8 dentro de las principales causas de mortalidad en la población mexicana, mientras que para el año 2012 ésta ascendió al sexto lugar, ocupando el cuarto cuando se incluyen únicamente individuos mayores de 60 años, como se observa en la **tabla 2** (INEGI, 2012).

Tabla 2. Defunciones totales por principales causas de mortalidad en México en individuos mayores de 60 años (INEGI, 2012).

	Causa	Defunciones	Tasa
Total		372 593	3420.4
1	Diabetes mellitus	62 887	577.3
2	Enfermedades isquémicas del corazón	61 225	562
3	Enfermedad cerebrovascular	26 180	240.3
4	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	21 057	193.3
5	Enfermedades hipertensivas	16 071	147.5
6	Cirrosis y enfermedades crónicas del hígado	14 291	131.2
7	Infecciones respiratorias agudas bajas	11 505	105.6
8	Nefritis y nefrosis	9 528	87.5
9	Desnutrición calórico proteínica	6 217	57.1
10	Tumor maligno de la próstata	5 582	51.2

-Factores de riesgo para el desarrollo de la EPOC

-Factores ambientales

La EPOC es una enfermedad multifactorial causada por factores agresores y nocivos para el pulmón, y las causas que la ocasionan son conocidas como factores de riesgo. Dentro de los factores asociados al desarrollo de EPOC, se encuentran los ambientales, tales como, la exposición a polvos, a humo de tabaco (tanto fumador activo como fumador pasivo), derivados de procesos industriales, a productos de combustión o por exposición al humo de leña y biomasa presentes en el ambiente (Dennis *et al.*, 1996, Pérez-Padilla *et al.*, 1996, Hnizdo *et al.*, 2002, Sansores y Venegas, 2002 y Zhou *et al.*, 2009).

A la vez, se ha encontrado una relación inversa entre el nivel socioeconómico y la prevalencia de EPOC, siendo las clases sociales más desfavorecidas donde se presenta un mayor desarrollo de la enfermedad, esto se atribuye a un mayor

consumo de tabaco y un mayor número de infecciones debido a la calidad de vida (GOLD, 2011).

Otros estudios sugieren una mayor susceptibilidad en mujeres (López-Varela *et al.*, 2010) mientras que la presencia de infecciones en el tracto respiratorio durante la infancia podrían predisponer a un deterioro funcional más rápido en la edad adulta y el consecuente desarrollo de la EPOC (Zhou *et al.*, 2009, de Marco *et al.*, 2011).

Por último, cabe mencionar que la prevalencia, morbilidad y la mortalidad de la EPOC aumentan con la edad (Miravittles *et al.*, 2009). Como se observa en la **figura 3**, la función pulmonar alcanza su máximo desarrollo en los adultos jóvenes (25 años) y disminuye a partir de la tercera década de vida.

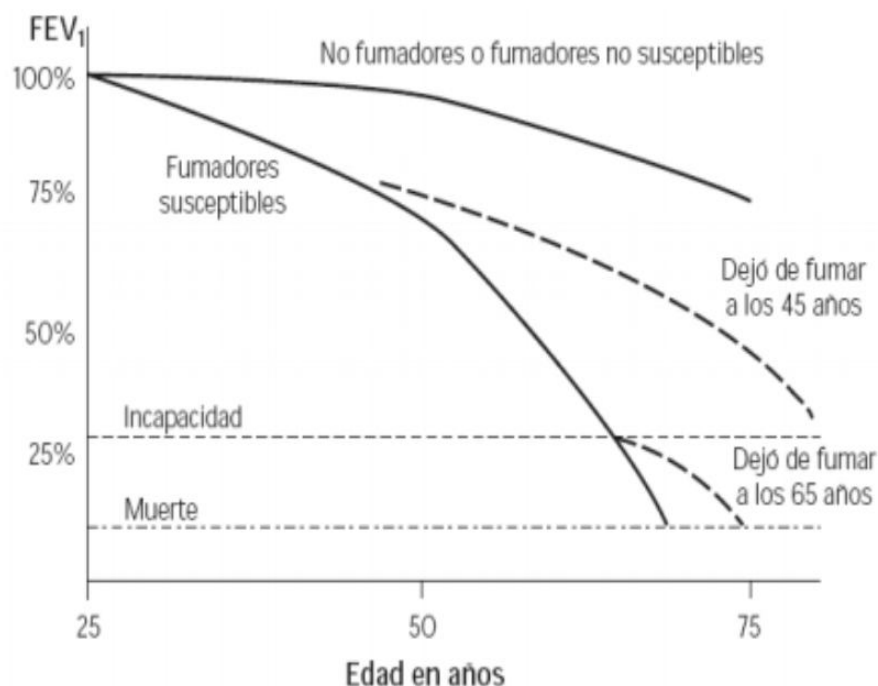


Figura 3. Evolución de la función pulmonar según la edad, hábito tabáquico y susceptibilidad. Modificado de Fletcher y Peto, 1977.

De los factores de riesgo mencionados anteriormente, el que más destaca es el hábito tabáquico; ya que ha sido el más frecuente y claramente asociado a la enfermedad (PLATINO, 2006 y GOLD, 2011). El riesgo es proporcional al consumo acumulado de tabaco, de tal forma que aumenta del 26% en fumadores de 15-30 paquetes/año, al 51% en fumadores que consumen más de 30 paquetes por año

(Miravittles *et al.*, 2009). Es importante mencionar que aun cuando la mayoría de las personas enfermas con EPOC presentan o presentaron historia tabáquica en alguna etapa de su vida (80-90%), solamente del 10 al 15% de todas las personas fumadoras sanas desarrollan la EPOC (Guo *et al.*, 2001, Manino *et al.* 2002 y Tarigan *et al.*, 2014) lo que sugiere que existen otros factores que confieren susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad. En este sentido, diversos estudios han reportado una fuerte correlación en el nivel de función pulmonar entre individuos con relaciones de parentesco (Burrows *et al.*, 1977, Wilk *et al.*, 2007) por lo que se ha propuesto que los factores genéticos confieren una variabilidad en la susceptibilidad individual a los efectos de los distintos factores de riesgo.

-Factores genéticos

Dentro de los factores genéticos, en la **tabla 3** se resumen las principales proteínas que han sido relacionadas con la EPOC, no obstante, el más estudiado y mayormente asociado a la enfermedad es la deficiencia de alfa-1 antitripsina. Esta proteína tiene una importante participación en la protección de las estructuras pulmonares actuando como inhibidora de las proteasas, especialmente sobre la elastasa secretada por neutrófilos, y su déficit favorece el desarrollo precoz de enfisema pulmonar al alterar el equilibrio entre proteasa-antiproteasa favoreciendo la destrucción de las paredes alveolares (Stoller y Aboussouan, 2005), sin embargo, ésta sólo se presenta y puede explicar en el 1 al 2% de los casos de individuos con EPOC (Silverman, 2002).

Tabla 3. Principales proteínas relacionadas con la EPOC o rasgos fenotípicos de la enfermedad

Proteína	Función	Hallazgo en EPOC	Autor
CCR5, CXCR3 y CXCR6	Quimioatrayentes de células T CD8+	Expresión incrementada en tejido pulmonar	Freeman <i>et al.</i> , 2007
IL-1 β	Activación de macrófagos alveolares	Células en cultivo liberan más IL-1 β posterior a la estimulación con humo de cigarro	Rusznak <i>et al.</i> , 2000
IL-6	Estimula la diferenciación de células B	Aumentado en esputo, lavado bronquialveolar y plasma en pacientes con EPOC.	Bucchioni <i>et al.</i> , 2003
IL-8	Quimioatrayente de neutrófilos	Altas concentraciones en esputo de pacientes con EPOC	Yamamoto <i>et al.</i> , 1997
Proteína C Reactiva	Opsonina inespecífica para fagocitosis de bacterias	Niveles séricos elevados en pacientes con EPOC	Pinto-Plata <i>et al.</i> , 2006

-Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)

Otra proteína relacionada con la etiología de la EPOC es el Factor de Necrosis Tumoral (TNF por sus siglas en inglés), la cual es una citocina proinflamatoria descubierta inicialmente en suero de ratones y posteriormente encontrada en el humano (Ibelgaufts, 1995), es uno de los mediadores más potentes de la respuesta

inflamatoria y puede encontrarse en dos formas moleculares, denominadas TNF- α o Caquexina y TNF- β o Linfotoxina (Tracey, 1994). El gen que codifica TNF- α se ubica en el brazo corto del cromosoma 6 dentro del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), contiene 3kb (kilobases) de longitud con tres intrones y cuatro exones separados por una secuencia compuesta por una a dos kb de DNA (Inoko y Trowsdale, 1987). Los exones codifican para un producto precursor de 239 aminoácidos y uno maduro de 157 después de la remoción de una cadena líder por parte de una metaloproteínasa unida a la membrana, dando lugar a la forma secretada, tres de estos fragmentos polipeptídicos polimerizan para formar una proteína circulante en forma de pirámide triangular como se observa en la **figura 4** (Pope *et al.*, 1994). El TNF- α puede ser inducido por virus, parásitos, bacterias, células tumorales así como IL 1, 2, 12, y el mismo TNF- α (Dinarello *et al.* 1999). Esta citocina es sintetizada y secretada por células del sistema inmune tales como monocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos T, y otros tipos celulares como las células epiteliales y células de músculo liso (Sibille *et al.*, 1990).

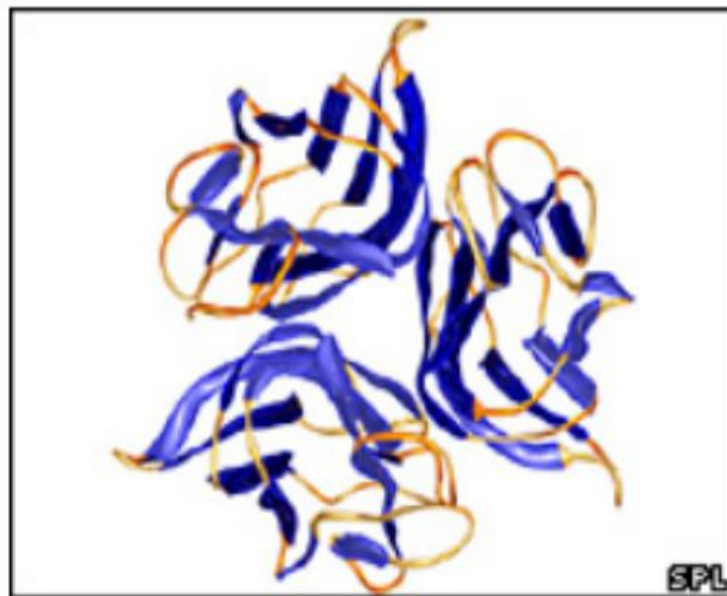


Figura 4. Estructura proteínica del factor de necrosis tumoral α . Tomado de <http://www.armonizandorosario.com>.

El efecto que tiene TNF- α en el pulmón es inducir la quimioatracción de células del sistema inmune al lugar de la inflamación, además, puede tener un rol central en la

expresión de moléculas de adhesión celular como ICAM1, VCAM1 y E-selectina. A su vez, funciona como un potente activador paracrino de la expresión de otras citocinas proinflamatorias, como IL 1, 6, y 8, y también se ha reportado un efecto autócrino para la producción de TNF- α (Sibille *et al.*, 1990). Estos incrementos en citocinas y en moléculas de adhesión, resultan en la activación y reclutamiento de macrófagos y neutrófilos, y la probabilidad de destrucción del tejido. También induce estrés oxidante, degranula al macrófago activado liberando radicales libres, y promueve la proliferación de músculo liso bronquial y altera su función contractil. (Huang *et al.*, 1997).

Como se observa en la **figura 5**, el humo de tabaco está relacionado con la expresión y secreción de TNF- α . Cuando éste es inhalado el organismo genera una respuesta temprana frente a las toxinas contenidas en él (por ejemplo, especies reactivas de oxígeno), dichas toxinas provocan lesiones en las células epiteliales y de músculo liso del parénquima pulmonar. Los daños generados inducen la expresión y secreción del TNF- α y se provoca una respuesta inflamatoria por parte del organismo. Durante la inflamación que se genera, el efecto de TNF- α es, por un lado, generar el reclutamiento de células leucocitarias provenientes del torrente sanguíneo, principalmente monocitos (que en tejido pulmonar maduran a macrófagos) y neutrófilos al sitio donde se produce el daño, estas células, además de secretar más TNF- α y activar células vecinas liberan elastasas como la metaloproteasa 12 (MMP12) que actúan sobre el epitelio alveolar generando un desequilibrio proteasa-antiproteasa que deriva en el desarrollo del enfisema pulmonar. Mientras que por otra vía, la secreción de TNF- α y unión de la proteína soluble a sus receptores específicos de membrana, induce la expresión del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) el cual se relaciona con la fibrogenesis característica durante la bronquitis crónica. Además, se ha encontrado un incremento en los niveles de TNF- α en sangre periférica de pacientes con EPOC (Agustí *et al.*, 2003, Gan *et al.*, 2004 e Higashimoto *et al.*, 2008), y de acuerdo con Tanni y cols (2010), la exposición al humo de cigarro está asociada con la presencia de niveles altos de TNF- α en individuos enfermos.

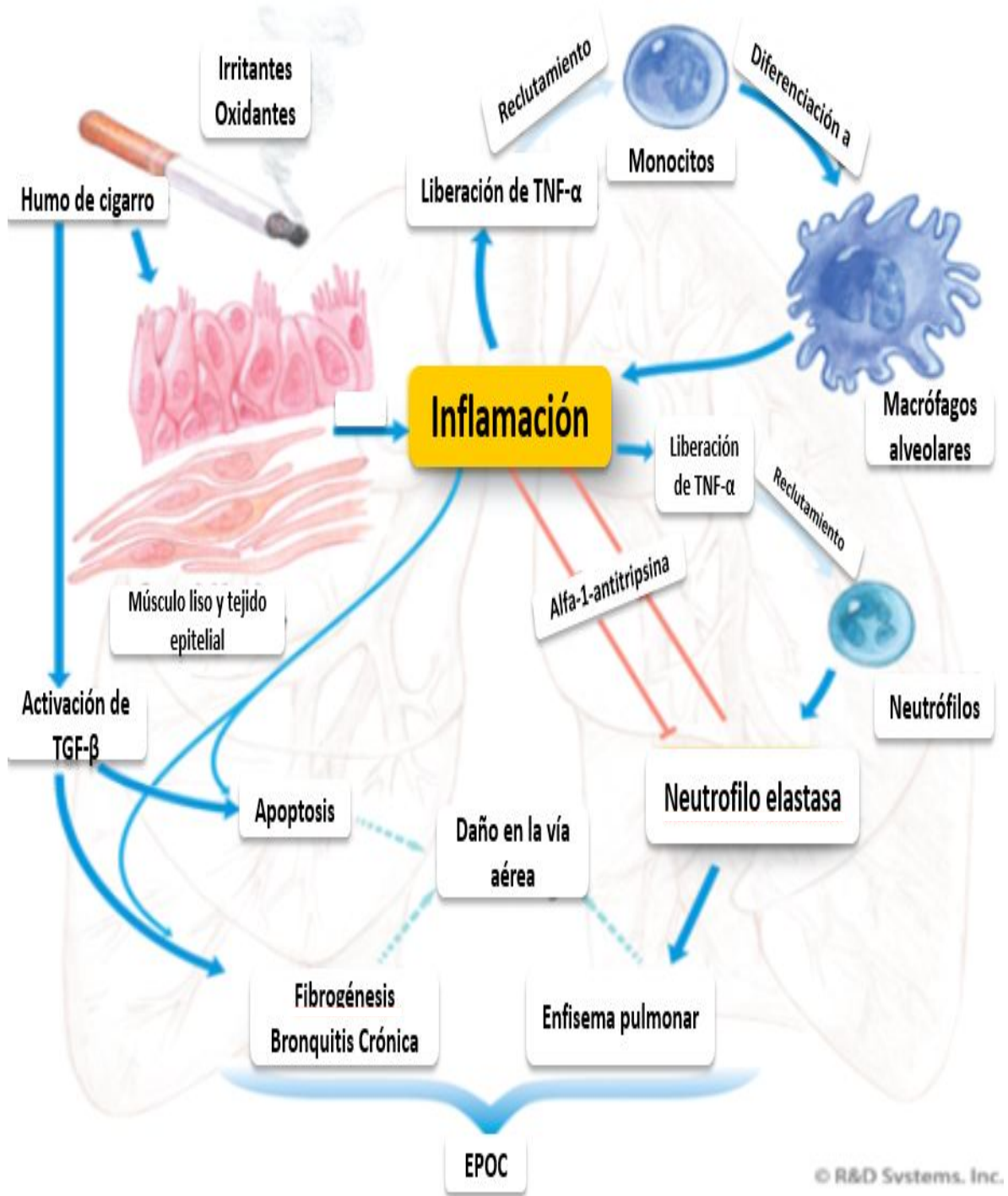


Figura 5. Relación del humo de tabaco con el proceso inflamatorio y el desarrollo de bronquitis crónica y enfisema pulmonar. Modificado de <https://www.rndsystems.com>

-Polimorfismos genéticos de TNF α

El gen que codifica para TNF- α es altamente polimórfico. Un polimorfismo genético es la existencia de distintos alelos en un determinado locus de un gen presente en una población, los cuales aparecen con una frecuencia significativa de por lo menos 1% en la población y pueden o no influir en la expresión y/o función de los genes. Estos polimorfismos pueden hallarse en microsatélites (STR) o en nucleótidos simples (SNP), los cuales pueden ubicarse dentro de la región promotora de un gen, o en la secuencia completa de éste (exones, intrones y regiones UTR) (Cornellis 1999). Estas alteraciones son consideradas como de “baja penetrancia” ya que confieren un riesgo del 1 al 10% a desarrollar una enfermedad, al contrario de las alteraciones de alta penetrancia las cuales hacen referencia a mutaciones genéticas y que confieren del 80 al 90% de riesgo a desarrollar cierto padecimiento.

En el caso de TNF- α se han reportado varios SNP, los cuales implican cambios o variantes alélicas de un solo nucleótido en un lugar específico del genoma, tal y como se observa en la **figura 6**.

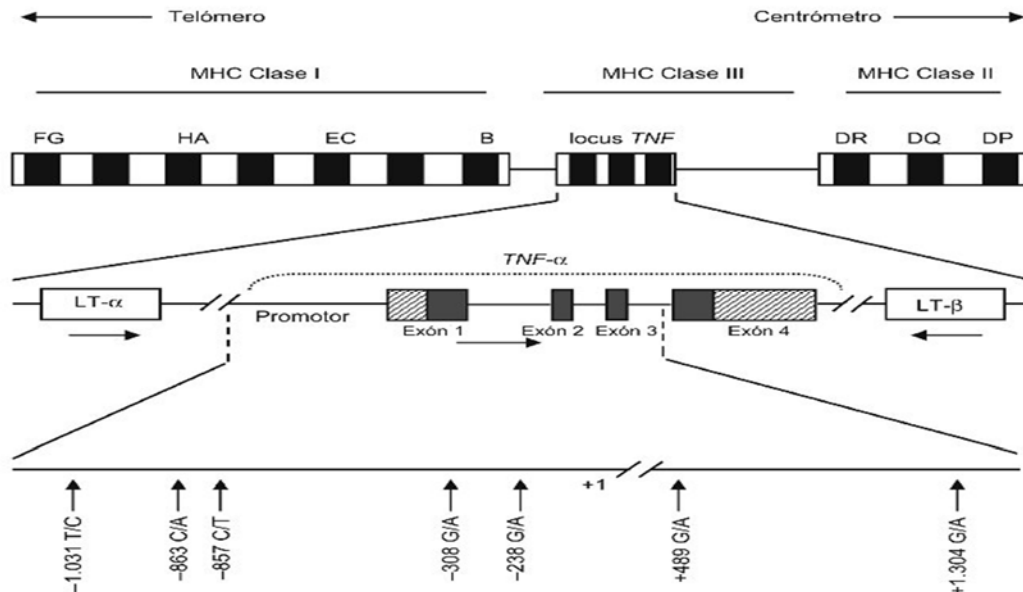


Figura 6. Ubicación genética del gen de TNF α en el brazo corto del cromosoma 6, en la región de MHC y localización de los polimorfismos TNF α -238 y TNF α -308. Tomado de Rego-Pérez *et al.*, 2009.

Antecedentes

Se han realizado estudios epidemiológicos de casos y controles sobre la asociación que puede existir entre polimorfismos del gen de TNF α y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en distintas poblaciones.

Gingo y cols. en 2008 encontraron una asociación negativa con el polimorfismo TNF α -238 (OR= 0.4, p= 0.02), es decir, se observó una frecuencia alélica mayor en individuos sanos que en pacientes con EPOC. El estudio se realizó con individuos caucásicos de nacionalidad estadounidense. En ambos grupos sólo se incluyeron individuos fumadores.

Trajkov y cols. (2009) buscaron la asociación existente entre polimorfismos de citocinas como IL-2, 4, 6, 10 y TNF α -238 con EPOC en individuos de población macedonia, y encontraron mayor frecuencia del polimorfismo en enfermos que en controles (OR= 1.319) pero la diferencia no resultó estadísticamente significativa (p= 0.524). En ambos grupos se incluyeron tanto fumadores como no fumadores.

Sapey y cols. en 2010 trabajaron con pacientes con EPOC de población inglesa, y observaron que el polimorfismo TNF α -238 se correlaciona positivamente con la presencia de bronquitis crónica, así como con un bajo índice de masa corporal y un mayor decremento anual en volumen espiratorio forzado (FEV), comparado con individuos enfermos que no presentaron el polimorfismo.

En el 2014 Tarigan y cols. en individuos de población indonesia, reportan un OR de 2.094, con una frecuencia de la variante alélica mayor en casos que en controles, pero no encuentran una asociación estadísticamente significativa entre TNF α -238 y EPOC (p= 0.241). Para ambos grupos sólo se incluyeron individuos fumadores.

En el mismo año (2014), Chiang y Chuang trabajaron con individuos de población taiwanesa, encontrando una asociación positiva entre TNF α -238 y EPOC, la asociación resultó estadísticamente significativa al comparar tanto un grupo control sin fumadores con EPOC (p= 0.002), como un grupo control sólo con fumadores con EPOC (p= 0.015).

Respecto al polimorfismo TNF α -308, Huang y cols. trabajaron en 1997 con individuos de población taiwanesa, donde los grupos de casos y controles están compuestos por personas fumadoras, reportan una asociación positiva entre TNF α -308 y pacientes con bronquitis crónica con un OR de 11.1 y una $p < 0.001$.

En el año 2001, Sakao y cols. realizaron un estudio con individuos enfermos que tenían hábito tabáquico de población japonesa donde sugieren que el polimorfismo TNF α -308 puede estar asociado con el desarrollo de enfisema en pacientes con EPOC

Jiang y cols., en 2005 trabajaron con individuos de población china donde incluyeron individuos fumadores y no fumadores en ambos grupos (casos y controles), a pesar de que se reporta un OR de 5.0, la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0.131$).

En 2008, Gingo y cols. encuentran una asociación positiva entre TNF α -308 y EPOC (OR= 1.9, $p = 0.03$) al comparar individuos sanos y pacientes con EPOC de población estadounidense (sólo caucásicos), ambos grupos representados por personas fumadoras.

Stankovic y cols, en el 2009 reportan el primer trabajo donde muestran una asociación negativa entre TNF α -308 y la EPOC (OR= 0.44, $p = 0.043$).

Ezzeldin y cols, en 2012 buscaron la asociación de TNF α -308 y EPOC en individuos de población egipcia, en quienes la presencia de dicho polimorfismo se correlaciona con el hábito tabáquico para una predisposición al desarrollo de EPOC y el declive de funciones pulmonares.

En 2014, Tarigan y cols. trabajando con individuos fumadores para ambos grupos (casos y controles) de población indonesia, reportan una asociación negativa entre TNF α -308 y EPOC, encontrando una frecuencia de la variante alélica mayor en los controles que en los casos (OR= 0.436) con una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.014$).

En 2015, Reséndiz-Hernández y cols., investigaron si algunos de los polimorfismos de la región promotora del gen de TNF α tienen alguna asociación con EPOC en individuos de población mexicana, encontrando que los polimorfismos TNF α -238 (OR= 4.220, p= 0.001) y -308 (OR= 2.07, P= 0.038) se correlacionaron con la enfermedad. Tanto en casos como en controles se incluyeron solamente individuos fumadores.

En las **tablas 3 y 4** se muestran de manera resumida los estudios mencionados anteriormente.

Por último, no se ha encontrado relación alguna entre los polimorfismos TNF α -238 y -308 con EPOC en población italiana (Ferrarotti *et al.*, 2002), holandesa (Küçükaycan *et al.*, 2002), rusa (Danilko *et al.*, 2007) y turca (Ozdogan *et al.*, 2014).

Tabla 4. Asociación del polimorfismo TNF α -238 con la EPOC analizada en diferentes poblaciones.

Autor	Pol.	País	Casos	Controles	OR, p
Gingo <i>et al.</i> , 2008	-238	Estados Unidos	298	125	OR=0.40, p=0.002
Trajkov <i>et al.</i> , 2009	-238	Macedonia	60	301	OR=1.46
Tarigan <i>et al.</i> , 2014	-238	Indonesia	93	93	OR=2.09, p= 0.241
Chiang y Chuang, 2014	-238	Taiwán	110	110	p= 0.002

Tabla 5. Asociación del polimorfismo TNF α -308 con la EPOC analizada en diferentes poblaciones.

Autor	Pol.	País	Casos	Controles	OR, p
Huang <i>et al.</i> , 1997	-308	Taiwán	42	42	OR=11.1
Sakao <i>et al.</i> , 2001	-308	Japón	106	110	OR=2.15
Jiang <i>et al.</i> , 2005	-308	China	111	97	OR=5.0
Gingo <i>et al.</i> , 2008	-308	Estados Unidos	298	125	OR=1.9, p=0.03
Stankovic <i>et al.</i> , 2009	-308		97	102	
Tarigan <i>et al.</i> , 2014	-308	Indonesia	93	93	OR= 0.436, p=0.014

Justificación

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica es el problema respiratorio de mayor prevalencia e impacto socioeconómico a nivel mundial mientras que en México es la sexta causa de muerte a nivel nacional. A pesar de que el hábito tabáquico es el principal factor de riesgo ambiental asociado a la enfermedad no todos los individuos fumadores desarrollan EPOC, por lo tanto a la fecha no es claro cuáles son los factores de riesgo que confieren distinta susceptibilidad individual. Con base en lo anterior resulta importante el estudio de los factores genéticos que puedan estar involucrados en el padecimiento y el rol que pueden ejercer durante el desarrollo de la enfermedad. Dentro de estos se ha encontrado relación de distintas proteínas involucradas con el proceso inflamatorio (IL-1 β , IL-6, IL-8, PCR) con la EPOC y específicamente para TNF α existen diversos estudios donde se relaciona la enfermedad con los polimorfismos que se encuentran en la región promotora del gen, rs361525 (G/A) ubicado en la posición -238 y rs1800629 (G/A) ubicado en la posición -308 por lo que estudiar su asociación en la población mexicana puede ser de utilidad para establecer su relación como factor de riesgo.

Con base en lo mencionado anteriormente, la hipótesis de este trabajo es que existirá una diferencia estadísticamente significativa con base en las frecuencias genotípicas determinadas por la presencia o ausencia de los polimorfismos rs361525 (TNF α -238) y rs1800629 (TNF α -308) entre individuos sin diagnóstico de EPOC y pacientes con diagnóstico de la misma.

Objetivos

-Objetivo general

Determinar la asociación de los polimorfismos TNF α -238 y TNF α -308 con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en una muestra de población mexicana.

-Objetivos particulares

-Determinar las características epidemiológicas de edad, sexo, hábito tabáquico y exposición al humo de leña entre grupos de individuos sin diagnóstico de EPOC (controles) e individuos con diagnóstico de EPOC (casos).

-Determinar si los polimorfismos TNF α -238 y TNF α -308 se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg y en desequilibrio de ligamiento con base en las frecuencias alélicas y genotípicas en los grupos de casos y controles.

-Determinar si existe alguna asociación de los polimorfismos TNF α -238 y TNF α -308 con la EPOC con base en las frecuencias genotípicas y alélicas.

-Determinar si existe alguna asociación entre las variables epidemiológicas y las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos TNF α -238 y TNF α -308 comparando los grupos de casos y controles.

Materiales y método

El presente estudio se realizó con la debida aprobación del protocolo por parte de los Comités de Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER) y del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Se realizó un estudio retrospectivo de casos y controles con un muestreo de tipo transversal.

-Determinación del tamaño de muestra

Se realizó una estimación del tamaño de muestra necesario para un estudio de casos y controles para determinar la asociación de las variantes polimórficas con la EPOC, utilizando la siguiente fórmula (Campbell, 1995):

$$n = \left(\frac{z_{1-\alpha/2} \sqrt{2p(1-p)} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}}{p_1 - p_2} \right)^2$$

Donde:

$$P = \frac{p_1 + p_2}{2};$$

p_1 es la frecuencia de exposición entre los casos.

p_2 es la frecuencia de exposición entre los controles.

$Z_{1-\alpha/2}$ y $Z_{1-\beta}$ son valores que se obtienen de la distribución normal estándar en función de la seguridad y potencia seleccionadas para el estudio. En el presente estudio, para un nivel de seguridad de un 95% y una potencia estadística del 80%, se tiene que $Z_{1-\alpha/2} = 1.96$ y $Z_{1-\beta} = 0.84$.

El resultado que se obtuvo fue que se requería un tamaño de muestra de 143 para el polimorfismo TNF α -238 y de 137 para el polimorfismo TNF α -308.

-Población de estudio

Los criterios de inclusión para seleccionar las muestras del grupo de casos fueron: pacientes que hayan sido diagnosticados con EPOC en cualquier estadio de la enfermedad, tanto fumadores como no fumadores, con base en los resultados de espirometrías ($FEV1/FVC < 70\%$) aplicadas por parte del personal del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, así como ser de nacionalidad mexicana y contar tanto con padres como con abuelos también mexicanos. Por el otro lado, los criterios de exclusión para eliminar muestras fueron: pacientes que presenten algún otro padecimiento pulmonar o problema respiratorio tales como asma, tuberculosis pulmonar, fibrosis pulmonar, cáncer de pulmón, etc., que no sean mexicanos, padres o abuelos extranjeros, expediente médico incompleto y que entre pacientes hayan sido parientes (**tabla 5**).

Tabla 6. Criterios de inclusión y exclusión para el grupo de casos.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
-Individuos diagnosticados con EPOC. -Nacionalidad y ascendencia mexicana. -Individuos sin relaciones de parentesco.	-Individuos sin diagnóstico de EPOC. -Parentesco entre individuos. -Sin nacionalidad y/o ascendencia mexicana. -Individuos con relaciones de parentesco.

Los criterios de inclusión tomados para seleccionar las muestras del grupo de controles fueron: individuos que hayan sido aceptados como donadores de sangre por parte del Hospital 20 de Noviembre del ISSSTE e Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por tanto, se clasificaron como individuos sanos. Por el contrario, los criterios de exclusión fueron: no ser de nacionalidad mexicana o tener algún padre o abuelo extranjero y que entre donadores hayan sido parientes (**tabla 6**).

Tabla 7. Criterios de inclusión y exclusión para el grupo de controles.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
-Individuos aceptados como donadores de sangre. -Nacionalidad y ascendencia mexicana -Individuos sin relaciones de parentesco.	-Parentesco entre individuos. -Sin nacionalidad y/o ascendencia mexicana. -Individuos con relaciones de parentesco.

A cada persona muestreada se le entregó la carta de consentimiento informado por lo que se obtuvieron sus firmas antes de extraer la sangre. Posteriormente se aplicaron cuestionarios a cada individuo para recabar información sobre las siguientes variables epidemiológicas: sexo, edad, fumador o no fumador y exposición a humo de leña; en el caso de los pacientes con EPOC, también se registró el estadio con el que fueron diagnosticados, así como el resultado obtenido de la espirometría realizada.

De acuerdo con los criterios empleados, se colectaron 135 muestras de pacientes con EPOC en el INER durante el período de 2011 a 2014, las cuales se parearon por edad y sexo con las muestras de sangre colectadas en el Hospital 20 de Noviembre, de esta manera, se obtuvo un total de 150 muestras (75 para grupo de casos y 75 para grupo control).

-Toma de muestras de sangre

Se extrajo un volumen de 8 mL de sangre periférica por el método de punción venosa, el cual se colocó en tubos vacutainer con EDTA para evitar la coagulación de la misma. Se guardaron en hielo en un recipiente de unicel con tapa para su traslado del hospital al laboratorio C-242 del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, donde se almacenaron a -20°C en un congelador marca REVCO hasta el momento de la extracción del DNA.

-Extracción y cuantificación de DNA

Una vez obtenidas las muestras de sangre, se realizó la extracción del DNA mediante el método de gradiente de sacarosa (modificado de Daly, 1996):

1.-En un tubo de 50 mL se vertió 5 mL de sangre y 45 mL de buffer de lisis, se agitó vigorosamente en un vórtex y posteriormente se centrifugó a 2000 G durante 20 minutos a 4°C.

2.-Se decantó el sobrenadante y el precipitado obtenido se resuspendió en 2 mL de buffer de suspensión y se agregan 0.5 mL de perclorato de sodio 5 M.

3.-La suspensión se mezcló agitando a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se incubó a 65°C durante 30 minutos.

4.-Se agregaron 2 mL de cloroformo a -20°C y se mezcló por agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos.

5.-Se centrifugó a 1400 g durante 20 minutos y posteriormente se transfirió la fase acuosa (que contiene el DNA) a otro tubo vacío.

6.-Se agregaron 2 volúmenes de etanol al 100% a 4°C y se invirtió el tubo varias veces hasta que la hebra del DNA se precipitó.

7.-La hebra de DNA se pasó a otro tubo con etanol frío al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente durante 20 minutos.

8.- Se resuspendió el DNA en agua libre de nucleasas durante 3 horas a una temperatura de 55°C.

Una vez finalizada la técnica, se determinó la integridad del DNA por electroforesis en geles de agarosa al 1%, la pureza y concentración de las muestras se evaluaron por medio de un espectrofotómetro ND-1000 Nanodrop. Las muestras se almacenaron en un congelador marca REVCO a -20°C hasta el momento de su utilización.

-Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a polimorfismos de longitud de fragmento de restricción (PCR-RFLP).

Se utilizó un termociclador Maxygene II marca LabNet para llevar a cabo la estandarización de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) acoplada a RFLP (polimorfismos de longitud de fragmento de restricción) con la que se amplificaron dos distintos fragmentos de DNA donde se localizan los sitios -238 y -308 de la región promotora del gen de TNF α . La reacción de PCR se hizo en un volumen final de 10 μ L el cual contenía: buffer 10x (Invitrogen), dNTP's 2 mM (Promega), oligonucleótidos sentido y antisentido 5 mM (Sigma Aldrich), cloruro de magnesio 50 mM (Invitrogen), 0.5 U de enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen), agua inyectable (PiSA) y 1 μ L de DNA de cada muestra de sangre obtenida de pacientes con EPOC o en su caso de individuos sanos. Los oligonucleótidos y condiciones de temperatura de alineamiento que permitieron la óptima amplificación de los dos fragmentos se muestran en la **tabla 7**.

Tabla 7. Oligos y condiciones de PCR

Polimorfismo (rs)	Oligo Secuencia 5'-3'	Longitud de Fragmento (pb)	Condiciones de PCR	Ciclos	Referencia
TNF α -238 (rs361525)	Sentido 5'-AGAAGACCCCCCTCGGAACC-3'	107	4 minutos - 94°C	30	Mousa <i>et al.</i> , 2014.
	Antisentido 5'-ATCTGGAGGAAGCGGTAGTG-3'		30 segundos - 94°C 30 segundos - 59°C 45 segundos - 72°C		
			4 minutos - 72°C		
TNF α -308 (rs1800629)	Sentido 5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3'	152	4 minutos - 94°C	30	Anoosheh <i>et al.</i> , 2011
	Antisentido 5'-TCCTCCCTGCTCCGATT CCG -3'		60 segundos - 94°C 60 segundos - 64°C 60 segundos - 72°C		
			8 minutos -72°C		

rs= referencia del SNP, pb= pares de bases.

Se localizó en la base de datos del National Center for Biotechnology Information la secuencia reportada del gen del factor de necrosis tumoral alfa, y con base en las secuencias de los oligos utilizados, se encontraron las secuencias teóricas de los dos fragmentos amplificados para la localización de ambos polimorfismos (TNF α -238 y TNF α -308). Las secuencias se muestran en la **tabla 8**.

Tabla 9. Secuencia teórica de nucleótidos de dos fragmentos amplificados de DNA por técnica de PCR que incluyen los sitios polimórficos TNF α - 238 Y TNF α -308. Los nucleótidos subrayados corresponden a los oligos sentido utilizados y a la secuencia complementaria de los oligos antisentido, en negritas se resaltan los nucleótidos (G) que corresponden a los sitios -238 y -308 de la región promotora del gen de TNF α (n° de acceso al GenBank AB202113.1).

GEN (rs)	Longitud de fragmento(pb)	Secuencia Teórica
TNF α -238 (rs361525)	152	5'- <u>AGAAGACCCCCCTCGGAACCGG</u> GAGCAGG GAGGATGGGGAGTGTGAGGGGTATCCTTGA TGCTTGTGTGTCCCCAACTTTCCAAATCCCC GCCCCCGCGATGGAGAAGAAACCGAGACAG AAGGTGCAGGGCC <u>CACTACCGCTTCCTCCA</u> <u>GAT</u> -3'
TNF α -308 (rs1800629)	107	5'- <u>AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCATGG</u> GGA CGGGGTTTCAGCCTCCAGGGTCCTACACACA AATCAGTCAGTGGCCCAGAAGACCCCCCT <u>C</u> <u>GGAATCGGAGCAGGGAGGA</u> -3'

Una vez hechas las amplificaciones, se prepararon geles de agarosa al 2.5% y se utilizó una cámara de electroforesis Sub-Cell GT Mini, marca BIORAD para correr los productos de PCR en buffer TAE 1X a 100 V con una fuente de poder Power Pac 200, marca BIORAD. El tamaño de producto teórico para el polimorfismo TNF α -238 es de 152 pb mientras que para TNF α -308 es de 107 pb, mismos que se compararon con un marcador de peso molecular de 100 pb (3 μ L) para verificar que se obtuvo el fragmento deseado (**figura 8**). El tiempo de corrida estandarizado que permitió la óptima migración del DNA fue de 30 minutos. Cada gel fue teñido con 100 mL de bromuro de etidio, para observar las bandas se utilizó un transiluminador de rayos UV marca UVP y se tomó foto a cada gel con una cámara Kodak logic 200 Imaging System las cuales fueron impresas en una impresora gráfica digital marca SONY.

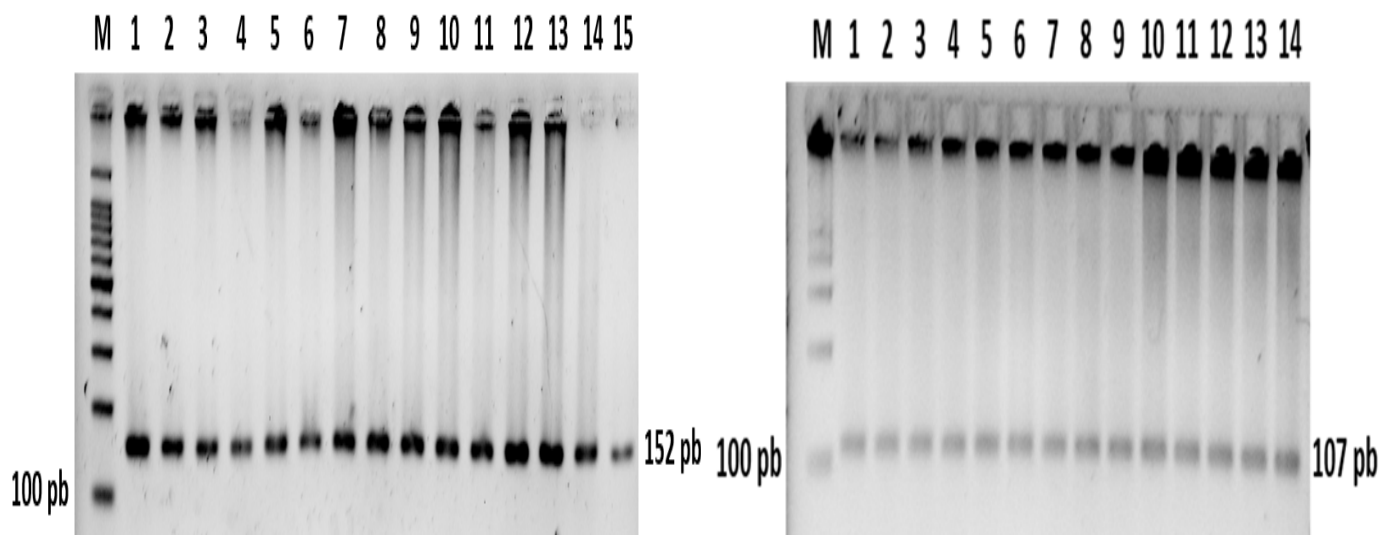


Figura 8. Productos de PCR que amplifican una parte de la región promotora del gen codificante para TNF α que incluye el sitio -238 (izquierda) -308 (derecha). Electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, los amplificados fueron visualizados tras teñir 5 μ L de cada producto de PCR con bromuro de etidio. M se refiere al marcador de peso molecular, 1 a 15 se refiere a DNA de individuos muestreados.

-Reacción de digestión enzimática

Para la determinación genotípica se llevaron a cabo reacciones de digestión utilizando las enzimas de restricción *MspI*: 5'...CCGG...3' para la identificación del polimorfismo TNF α -238 y *NcoI*: 5'...CCATGG...3' para la identificación del polimorfismo TNF α -308 (las bases subrayadas indican el sitio polimórfico). Se estandarizaron ambas reacciones para un volumen final de 10 μ L el cual contenía: "Buffer Tango" (Thermo Scientific), agua inyectable (PiSA), 3U de enzima *MspI* y 3 μ L de producto de PCR para el polimorfismo TNF α -238, y Buffer Tango (Thermo Scientific), agua inyectable (PiSA), 2U de enzima *NcoI* y 2 μ L de producto de PCR para el polimorfismo TNF α -308. Ambas reacciones se llevaron a cabo en una incubadora TC2123 marca Shel Lab, a una temperatura de 37°C durante 16 horas. Para observar los patrones obtenidos mediante el corte de cada enzima después del tiempo de incubación se volvió a correr un gel de agarosa.

Para identificar los patrones de banda con los que se llevó a cabo la determinación de los genotipos, se prepararon geles de agarosa al 4% los cuales fueron corridos con buffer TAE 1X a 100 V en una cámara de electroforesis MSMIDI, marca Cleaver Scientific Ltd. durante 50 minutos, que fue el tiempo que permitió la adecuada migración y diferenciación de las bandas de DNA. Cada gel fue teñido con 100 mL de bromuro de etidio durante 10 minutos, se utilizó un transiluminador de rayos UV marca UVP y se tomó foto a cada gel con una cámara Kodak logic 200 Imaging System las cuales se imprimieron en una impresora gráfica digital marca SONY.

Los patrones observados fueron los siguientes: para el polimorfismo TNF α -238 se encontró 1 banda para el genotipo silvestre de 132 pb, 2 bandas para el genotipo heterocigoto de 152 y 132 pb, y 1 banda para el genotipo mutante de 152 pb. Mientras que para el polimorfismo TNF α -308 se encontró 1 banda para el genotipo silvestre de 89 pb, 2 bandas para el genotipo heterocigoto de 109 y 89 pb, y 1 banda para el genotipo mutante de 109 pb (**Tabla 9**).

Tabla 10. Enzimas de restricción empleadas y patrones de digestión observados para la genotipificación de los polimorfismos TNF α -238 y TNF α -308.

GEN (rs)	Enzima de restricción	Tamaño de los fragmentos digeridos (pb)
TNF α -238 (rs361525)	MspI: 5'...C/CGG...3'	Silvestre (87)
		Heterocigoto (107, 87)
		Mutante (107)
TNF α -308 (rs1800629)	NcoI: 5'...C/CATGG...3'	Silvestre (133)
		Heterocigoto (152, 133)
		Mutante (152)

Cada muestra se comparó con un marcador de peso molecular de 100 pb que permitió establecer las diferencias entre distancia de migración de cada muestra y así poder identificar los genotipos. En la **Figura 9** se muestran las bandas observadas.

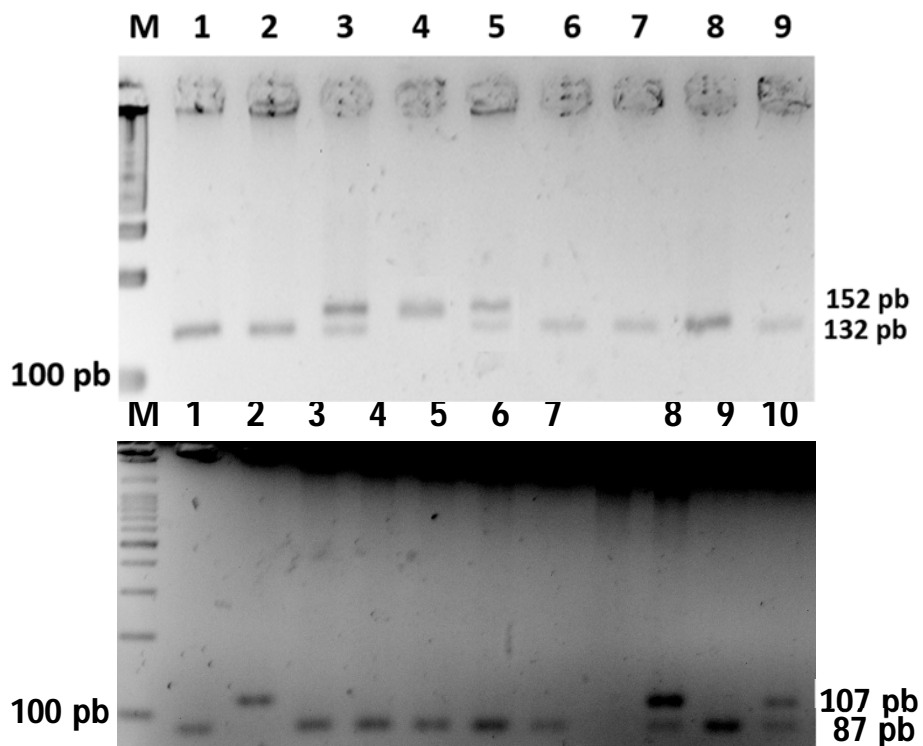


Figura 9. Productos de PCR sometidos a digestión enzimática para la identificación de los polimorfismos TNF α -238 (arriba) y TNF α -308 (abajo) con las enzimas de restricción MspI y NcoI respectivamente. M se refiere a marcador de peso molecular, 1 a 10 se refiere a DNA de individuos muestreados.

-Análisis estadístico

Respecto a los datos epidemiológicos obtenidos, se realizaron pruebas de T-student para establecer diferencias estadísticamente significativas con un nivel de significancia de $p < 0.05$ entre los grupos de casos y controles para las variables de edad, sexo, tabaquismo y exposición a humo de leña.

Las frecuencias genotípicas y alélicas se compararon entre los grupos de casos y controles para cada polimorfismo ($TNF\alpha$ -238 y $TNF\alpha$ -308) mediante la prueba de χ^2 y se midió la magnitud de la asociación con la cuantificación de la Razón de Momios (OR por sus siglas en inglés). Dichas pruebas estadísticas se realizaron con el software de Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS, por sus siglas en inglés) versión 15.0 y con GraphPad Prism versión 6, los resultados se consideraron estadísticamente significativos con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Mediante las frecuencias alélicas se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg y el desequilibrio de ligamiento. Dichas pruebas se realizaron con el programa SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>).

Resultados

-Características de la población

Al inicio se contaba con un número de muestras de 135 casos, sin embargo, el número se redujo a 75, debido a que las muestras se parearon por edad y sexo con las muestras de 75 controles, por lo que se obtuvo una n total de 150 muestras. Debido a que parte de los cuestionarios aplicados a los pacientes no fueron contestados correctamente, existen variaciones por ausencia de datos en los porcentajes obtenidos. En estos casos, se etiquetó como “sin dato”, con lo cual fue posible realizar las pruebas estadísticas.

Las características generales de ambos grupos se muestran en la **tabla 10**:

Tabla 11. Datos epidemiológicos del grupo de casos y del grupo de controles

Características	Control		Casos		p
	n	%	n	%	
1.- Sexo					
Hombres	35	46.66	35	46.66	
Mujeres	40	53.34	40	53.34	
2.- Edad¹ (años)					
a. 35 - 60	22	29.33	18	24	0.2512
b. 61-94	53	70.67	57	76	
3.- Tabaquismo²					
Fumadores	35	46.66	52	69.33	0.0001*
No fumadores	40	53.34	16	21.33	
Sin dato	0	0	7	(9.34)	
4.- Exposición al humo de leña²					
Expuestos	19	25.33	32	42.67	0.0094*
No expuestos	38	50.67	37	49.33	
Sin dato	18	24	6	8	

¹ = Prueba de t-student no pareada ($p < 0.05$), ² = Prueba de χ^2 ($p < 0.05$), * valor estadísticamente significativo.

Como se muestra en la **tabla 10**, para la variable de sexo ambos géneros están representados de la siguiente manera: mayor presencia de mujeres (40) que de

hombres (35) y debido a que la proporción fue la misma en ambos grupos no se aplicó algún estadístico.

En el caso de la edad, se tuvo un rango de los 35 a los 94 años, con una media de 66.3 años en el grupo control y 68.25 en el grupo de casos. Se decidió dividir los datos en 2 intervalos de acuerdo con las estadísticas del INEGI, donde se observa que la mortalidad de la EPOC se incrementa después de los 60 años de edad en la población mexicana, quedando distribuidos de la siguiente manera: de los 35 a los 60 años que representan el 29.33 y 24% de la n total en los grupos control y de casos respectivamente, y de los 61 a los 94 años de edad que representan el 70.67 76% de la n total en los grupos control y de casos respectivamente.

Se buscó parear las muestras en esta categoría, no obstante, si hubo variación en los datos pero al aplicar la prueba de t-student se encontró que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p=0.2512$).

Respecto al tabaquismo, hubo más individuos con este hábito en el grupo de los enfermos ($n=52$), que los sanos ($n=35$), y al aplicar la prueba de χ^2 se observó diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0001$). En este caso, no se tuvo registro de esta variable en 7 individuos enfermos, que representan el 9.34% del número total de individuos de este grupo.

Por último, se comparó la exposición al humo de leña y se observó que los individuos enfermos presentaron mayor exposición que el grupo control (32 contra 19 individuos respectivamente), mientras que en el caso de los individuos no expuestos, se observa una menor diferencia (38 individuos no expuestos en el grupo control y 37 individuos no expuestos en el grupo de casos) lo cual se debe a la ausencia de datos en ambos grupos: 18 de individuos sanos y 6 de pacientes con EPOC. También se aplicó una prueba de χ^2 con la cual se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0094$).

-Asociación del tabaquismo y exposición al humo de leña con la EPOC respecto al sexo

Se estratificó a la población de acuerdo con el sexo con el fin de observar la relación de esta variable con los factores de riesgo ambientales incluidos en este estudio: tabaquismo y exposición al humo de leña.

En la **tabla 11** se muestran los resultados obtenidos respecto al tabaquismo, se observan más individuos fumadores en el grupo de pacientes enfermos de ambos sexos comparado con el grupo control. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas tanto en hombres como en mujeres, en el caso de los hombres se obtuvo una $p= 0.0011$ mientras que en el caso de las mujeres se obtuvo una $p= 0.0096$.

Se encontró una asociación positiva entre el hábito tabáquico y la EPOC para ambos sexos ($p=0.0011$ para el sexo masculino y $p=0.0096$ para el sexo femenino).

Tabla 12. Asociación del tabaquismo con la EPOC respecto al sexo

TABAQUISMO						
	Masculino			Femenino		
	Control	Casos	p	Control	Casos	p
Fumadores	20	29	0.0011*	15	23	0.0096*
No fumadores	14	2		26	14	
Sin dato	0	3		0	4	

Prueba de χ^2 ($p<0.05$), * valor estadísticamente significativo.

Por otro lado, se realizó el análisis con la exposición al humo de leña, en la **tabla 12** se muestran los resultados obtenidos.

Se encontró que en el caso del sexo masculino, hubo más individuos expuestos en el grupo de enfermos (n=11) que en el grupo de controles (n=8), sin embargo, al realizar la prueba de χ^2 no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa (p=0.2403).

Mientras que en el caso del sexo femenino, también hubo más individuos expuestos en el grupo de pacientes con EPOC (n=21) comparado con el grupo de individuos sanos (n=11). En este caso, al realizar la prueba de χ^2 , si se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa (p= 0.0282). Se encontró una asociación positiva entre la exposición al humo de leña y la EPOC solamente con el sexo femenino.

Tabla 13. Asociación de la exposición al humo de leña y la EPOC respecto al sexo

EXPOSICIÓN AL HUMO DE LEÑA						
	Masculino			Femenino		
	Control	Casos	p	Control	Casos	p
Expuestos	8	11	0.2403	11	21	0.0282*
No expuestos	18	20		20	17	
Sin dato	8	3		10	3	

Prueba de χ^2 (p<0.05), * valor estadísticamente significativo.

-Determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg y el desequilibrio de ligamiento.

Con las frecuencias genotípicas del grupo control, se hizo el cálculo para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg para ambos polimorfismos: TNF α -238 y TNF α -308. Se encontró una $p=0.9663$ en el caso del primero y una $p=0.7182$ en el caso del segundo, con lo que se comprueba que las frecuencias están en equilibrio y no están cambiando con el paso de las generaciones.

En la **tabla 13** se muestran los resultados de la determinación del desequilibrio de ligamiento entre los dos polimorfismos. Se hizo el análisis para cada grupo, encontrándose que los sitios polimórficos -238 y -308 de la región promotora del gen de TNF α no están en desequilibrio de ligamiento, por lo que éstos se heredan de forma independiente.

Tabla 14. Determinación del desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos -238 (G/A) y -308 (G/A) del gen de TNF α .

Polimorfismos	Controles		Casos	
	D'	p	D'	p
-238 GA / -308 GA	0.752	0.4875	0.0059	0.2242

D' = desequilibrio de ligamiento

-Asociación del polimorfismo TNF α -238 con la EPOC.

En la **tabla 14** se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas para el polimorfismo TNF α -238 en cada uno de los grupos.

El polimorfismo se presentó con mayor frecuencia en el grupo de los individuos sanos (n=16) comparado con el grupo de los individuos enfermos (n=5).

Se realizó la prueba de χ^2 para comparar los genotipos heterocigoto (G/A) y mutante (A/A) contra el genotipo silvestre (G/G) y se calculó la razón de momios (OR) para medir la magnitud de la asociación existente. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa solamente al comparar genotipo heterocigoto contra silvestre con una OR de 0.2810 y una $p=0.0149$.

Tabla 15. Frecuencias genotípicas y alélicas de TNF α -238 del grupo de casos contra el grupo de controles.

	Casos (frecuencia)	Controles (frecuencia)	OR (I.C.95%)	p
TNFα-238				
n	75	75		
G/G	70 (0.94)	59 (0.786)		
G/A	5 (0.06)	15 (0.20)	0.2810 (0.096-0.8191)	0.0149*
A/A	0 (0)	1 (0.014)	0.2813 (0.0112-7.041)	0.2782
Alelos				
TNF1 (G)	140 (0.9666)	140 (0.887)		
TNF2 (A)	10 (0.0333)	10 (0.114)		

Prueba de χ^2 ($p<0.05$), I.C.= intervalo de confianza, OR= odds ratio (razón de momios), * valor estadísticamente significativo.

Se estratificó la población por edad, sexo, tabaquismo y exposición al humo de leña para determinar las asociaciones existentes entre las variables epidemiológicas con el polimorfismo TNF α -238.

De acuerdo con los datos de edad, estos se agruparon en dos intervalos: de los 35 a los 60 años, y de los 61 a los 94 años. Esta división se realizó tomando en cuenta las estadísticas del INEGI, donde se observa que la mortalidad de esta enfermedad se incrementa después de los 60 años de edad en la población mexicana.

Al comparar el genotipo silvestre con el genotipo heterocigoto en los intervalos de edad, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el intervalo comprendido entre la edad de los 61 a los 94 años, el cual de acuerdo con la **tabla 10** representan el 70.67% de la población total en el grupo control y el 76% en el grupo de los casos, esto con una OR de 0.2071 y una $p=0.0133$. (**tabla 15**). En el mismo intervalo de edad, también estuvo presente el genotipo mutante en el grupo control por lo que se realizó el análisis con el modelo dominante, encontrando que la diferencia estadísticamente significativa se mantuvo (OR=0.1898, $p=0.0080$).

Tabla 16. Asociación de las frecuencias del polimorfismo TNF α -238 respecto a los intervalos de edad entre los grupos de casos y controles.

Genotipo	Controles	Casos	OR (I.C. 95%)	p
35-60				
WT-G/G	18	16	0.5625 (0.09055-3.494)	0.5332
HET-G/A	4	2		
MUT-A/A	0	0		
61-94				
WT-G/G	41	54	0.2071 (0.05422-0.7008)	0.0133*
HET-G/A	11	3		
MUT-A/A	1	0		
Modelo dominante				
WT-G/G	41	54	0.1898 (0.05025-0.7170)	0.0080*
HET+MUT	12	3		

Prueba de χ^2 ($p<0.05$), I.C.= intervalo de confianza, OR= odds ratio (razón de momios), * valor estadísticamente significativo.

Se estratificó a la población de acuerdo con la variable de sexo y se compararon las frecuencias genotípicas del polimorfismo TNF α -238. Se analizó con el modelo codominante y posteriormente con el modelo dominante (**tabla 16**).

En el caso de las mujeres solamente se utilizó el modelo codominante debido a la ausencia de genotipo mutante (A/A); al comparar el genotipo silvestre (G/G) con el genotipo heterocigoto (G/A) se encontró una diferencia estadísticamente significativa (OR=0.1823, p=0.0233).

Sin embargo, en el caso de los hombres, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el genotipo silvestre contra el genotipo heterocigoto o mutante (OR=0.4355, p=0.2614 y OR=0.291, p=0.2886 respectivamente). Así mismo, al realizar el análisis bajo el modelo dominante, tampoco se obtuvo diferencia significativa (OR=0.3733, p=0.1708).

Tabla 17. Asociación de las frecuencias del polimorfismo TNF α -238 respecto al sexo entre los grupos de casos y controles.

FEMENINO					MASCULINO			
Genotipo	Control	Casos	OR (I.C.95%)	p	Control	Casos	OR (I.C.95%)	p
Modelo codominante								
Silvestre-G/G	32	39			27	31		
Heterocigoto-G/A	9	2	0.1823 (0.036-0.905)	0.0233*	6	3	0.4355 (0.099-1.412)	0.2614
Mutante-A/A	0	0	-	-	1	0	0.2910 (0.011-7.446)	0.2886
Modelo dominante								
SILVESTRE	32	29			27	31		
HET+MUT	9	2	0.1823 (0.036-0.905)	0.0233*	7	3	0.3733 (0.087-1.588)	0.1708

Prueba de χ^2 (p<0.05), I.C.= intervalo de confianza, OR= odds ratio (razón de momios), * valor estadísticamente significativo.

Se compararon las frecuencias genotípicas del polimorfismo TNF α -238 de acuerdo con la estratificación de la población respecto al tabaquismo. Se realizó el análisis bajo el modelo codominante y posteriormente bajo el modelo dominante (**tabla 17**).

En el caso de individuos fumadores, se encontró una diferencia estadísticamente significativa al comparar el genotipo silvestre (G/G) contra el genotipo heterocigoto (G/A) con una OR de 0.2449 y una $p=0.0413$, no se pudo comparar con el genotipo mutante (A/A) debido a la ausencia de este genotipo en la población de estudio.

En el caso de individuos no fumadores, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el genotipo silvestre contra el heterocigoto o mutante (OR= 0.1123, $p=0.05$ y OR=0.6364, $p=0.4749$ respectivamente). No obstante, bajo el modelo dominante sí se obtuvo una diferencia significativa con una OR de 0.1005 y una $p= 0.0384$.

Tabla 18. Asociación de las frecuencias del polimorfismo TNF α -238 respecto al hábito tabáquico entre los grupos de casos y controles.

FUMADORES					NO FUMADORES			
Genotipo	Control	Casos	OR (I.C.95%)	p	Control	Casos	OR (I.C.95%)	p
Modelo codominante								
Silvestre-G/G	28	49			31	16		
Heterocigoto-G/A	7	3	0.2449 (0.058-1.02)	0.0413*	8	0	0.1123 (0.0060-2.071)	0.05
Mutante-A/A	0	0	-	-	1	0	0.6364 (0.0245-16.52)	0.4749
Modelo dominante								
SILVESTRE	28	49			31	16		
HET+MUT	7	3	0.2449 (0.058-1.02)	0.0413*	9	0	0.1005 (0.00549-1.838)	0.0384*

Prueba de χ^2 ($p<0.05$), I.C.= intervalo de confianza, OR= odds ratio (razón de momios), * valor estadísticamente significativo.

Se estratificó la población de acuerdo con la exposición al humo de leña y se compararon las frecuencias genotípicas del polimorfismo TNF α -238. Se realizó el análisis bajo el modelo codominante (**tabla 18**).

En este caso no fue posible realizar el análisis bajo el modelo dominante debido a que el genotipo mutante (A/A) no estuvo representado en nuestra población de estudio.

Respecto a los individuos expuestos al humo de leña, se encontró una OR de 0.2897 al comparar el genotipo silvestre (G/G) contra el genotipo heterocigoto (G/A), sin embargo, la asociación no fue estadísticamente significativa ($p=0.1077$).

Por otro lado, en los individuos sin exposición al humo de leña, al comparar el genotipo silvestre contra el genotipo heterocigoto, se encontró una OR de 0.2361 sin una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.1745$).

Tabla 19. Asociación de las frecuencias del polimorfismo TNF α -238 respecto a la exposición a humo de leña entre los grupos de casos y controles.

EXPUESTOS A HUMO DE LEÑA					NO EXPUESTOS			
Genotipo	Control	Casos	OR (I.C.95%)	p	Control	Casos	OR (I.C.95%)	p
Modelo codominante								
Silvestre-G/G	14	29			34	36		
Heterocigoto-G/A	5	3	0.2897 (0.060-1.389)	0.1077	4	1	0.2361 (0.025-2.221)	0.1745
Mutante-A/A	0	0	-	-	0	0	-	-

Prueba de χ^2 ($p<0.05$), I.C.= intervalo de confianza, OR= odds ratio (razón de momios), * valor estadísticamente significativo.

-Asociación del polimorfismo TNF α -308 con la EPOC.

En la **tabla 19** se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas para el polimorfismo TNF α -308 en cada uno de los grupos.

El polimorfismo se presentó con mayor frecuencia en el grupo de los individuos enfermos (n=18) comparado con el grupo de los individuos sin diagnóstico de EPOC (n=6).

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa al comparar genotipo heterocigoto contra silvestre con una OR de 3.430 y una p=0.0114. En el caso del genotipo mutante contra el silvestre, la asociación encontrada no fue estadísticamente significativa (OR=3.626, p=0.2735).

Tabla 20. Frecuencias genotípicas y alélicas de TNF α -308 del grupo de casos contra el grupo de controles.

	Casos (frecuencia)	Controles (frecuencia)	OR (IC95%)	p
TNFα-308				
n	75	75		
G/G	57 (0.76)	69 (0.92)		
G/A	17 (0.226)	6 (0.08)	3.430 (1.268-9.276)	0.0114*
A/A	1 (0.014)	0 (0)	3.626 (0.1448-90.79)	0.2735
Alelos				
TNF1 (G)	131 (0.8733)	144 (0.96)		
TNF2 (A)	19 (0.1267)	6 (0.04)		

Prueba de χ^2 ($p < 0.05$), I.C.= intervalo de confianza, OR= odds ratio (razón de momios), * valor estadísticamente significativo.

De la misma manera, se estratificó la población por edad, sexo, tabaquismo y exposición al humo de leña para determinar las asociaciones existentes entre las variables epidemiológicas con el polimorfismo TNF α -308.

De acuerdo con los datos de edad, estos se agruparon en dos intervalos: de los 35 a los 60 años, y de los 61 a los 94 años. Esta división se realizó tomando en cuenta las estadísticas del INEGI, donde se observa que la mortalidad de esta enfermedad se incrementa después de los 60 años de edad en la población mexicana.

Al comparar el genotipo silvestre con el genotipo heterocigoto en los intervalos de edad (**tabla 20**), se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el intervalo comprendido entre la edad de los 61 a los 94 años, el cual de acuerdo con la **tabla 10** representan el 70.67% de la población total en el grupo control y el 76% en el grupo de los casos, esto con una OR de 3.512 y una $p=0.0193$. En el mismo intervalo de edad, también estuvo presente el genotipo mutante en el grupo control por lo que se realizó el análisis con el modelo dominante, encontrando que la diferencia estadísticamente significativa se mantuvo (OR=3.746, $p=0.0130$).

Tabla 21. Asociación de las frecuencias del polimorfismo TNF α -308 respecto a los intervalos de edad entre los grupos de casos y controles.

Genotipo	Controles	Casos	OR (I.C. 95%)	p
35-60				
WT-G/G	21	16	2.625 (0.2181-31.59)	0.4329
HET-G/A	1	2		
MUT-A/A	0	0		
61-94				
WT-G/G	48	41	3.512 (1.175-10.50)	0.0193*
HET-G/A	5	15		
MUT-A/A	0	1		
Modelo dominante				
WT-G/G	48	41	3.746 (1.263-11.12)	0.0130*
HET+MUT	5	16		

Prueba de χ^2 ($p<0.05$), OR= odds ratio (razón de momios), I.C.= intervalo de confianza, * valor estadísticamente significativo.

Se estratificó a la población de acuerdo al sexo, se compararon las frecuencias genotípicas del polimorfismo TNF α -308 obtenidas en cada grupo, y se analizaron bajo el modelo codominante y posteriormente bajo el modelo dominante.

Como se observa en la **tabla 21** al realizar el análisis con el modelo codominante, en el sexo femenino sólo se comparó el genotipo heterocigoto (G/A) contra el genotipo silvestre (G/G) debido a que el genotipo mutante (A/A) no estuvo representado, se obtuvo una OR de 1.414 (IC=0.443-4.514) sin una diferencia estadísticamente significativa (p=0.5572). Mientras que para el sexo masculino, al comparar el genotipo heterocigoto contra el silvestre se obtuvo una OR de 26.76 con diferencia estadísticamente significativa (p=0.011), por el contrario, no se observó diferencia significativa al comparar genotipo mutante contra silvestre (p=0.2395); y al analizar con el modelo dominante se obtuvo que la diferencia significativa se mantiene con una OR de 29.57 y una p=0.0006.

Tabla 22. Asociación de las frecuencias del polimorfismo TNF α -308 respecto al sexo entre los grupos de casos y controles.

FEMENINO					MASCULINO			
Genotipo	Control	Casos	OR (I.C.95%)	p	Control	Casos	I.C.95%	p
Modelo codominante								
Silvestre-G/G	32	39			34	24		
Heterocigoto-G/A	9	2	1.414 (0.443-4.514)	0.5572	0	9	26.76 (1.485-482)	0.011*
Mutante-A/A	0	0	-	-	0	1	4.224 (0.164-108.2)	0.2395
Modelo dominante								
SILVESTRE	32	39			34	25		
HET+MUT	9	2	1.414 (0.443-4.514)	0.5572	0	10	29.57 (1.652-529.2)	0.0006*

Prueba de χ^2 (p<0.05), I.C.= intervalo de confianza, OR= odds ratio (razón de momios), * valor estadísticamente significativo.

Se estratificó a la población de acuerdo con el hábito tabáquico y se compararon las frecuencias genotípicas del polimorfismo de TNF α -308 bajo el modelo codominante y posteriormente bajo el modelo dominante (**tabla 22**).

Respecto a los individuos fumadores, no se tuvo registro del genotipo mutante (A/A) y al comparar el genotipo silvestre (G/G) con el genotipo heterocigoto (G/A) se obtuvo una OR de 0.691 sin una diferencia significativa ($p=0.546$).

Por el otro lado, al comparar individuos fumadores se obtuvo una OR de 14.53 con diferencia significativa ($p= 0.0017$) comparando genotipo silvestre contra heterocigoto, mientras que comparando genotipo silvestre contra mutante, no se encontró diferencia significativa (OR=3.348, $p=0.2941$). La diferencia estadísticamente significativa se mantiene al realizar el modelo dominante con una OR de 15.65 y una $p=0.0011$.

Tabla 23. Asociación de las frecuencias del polimorfismo TNF α -308 respecto al hábito tabáquico entre los grupos de casos y controles.

FUMADORES					NO FUMADORES			
Genotipo	Control	Casos	OR (I.C.95%)	p	Control	Casos	OR (I.C.95%)	p
Modelo codominante								
Silvestre-G/G	35	13			38	34		
Heterocigoto-G/A	5	3	0.691 (0.1292-2.96)	0.546	1	13	14.53 (1.804-117.1)	0.0017*
Mutante-A/A	0	0	-	-	0	1	3.348 (0.1319-84.99)	0.2941
Modelo dominante								
SILVESTRE	35	13			38	34		
HET+MUT	5	3	0.691 (0.1292-2.96)	0.546	1	14	15.65 (1.952-125.4)	0.0011*

Prueba de χ^2 ($p<0.05$), I.C.= intervalo de confianza, OR= odds ratio (razón de momios), * valor estadísticamente significativo.

Se compararon las frecuencias genotípicas del polimorfismo TNF α -308 estratificando la población respecto a la exposición al humo de leña. Se realizó el análisis bajo el modelo codominante y posteriormente bajo el modelo dominante.

Como se observa en la **tabla 23**, en el caso de los individuos expuestos al humo de leña, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el genotipo silvestre (G/G) con el genotipo heterocigoto (G/A) ni con el genotipo mutante (A/A) (OR= 2.479, p= 0.2815 y OR=2.143, p=0.4039 respectivamente); así mismo, tampoco se observó diferencia al realizar el análisis bajo el modelo dominante (OR=2.883, p=0.2081).

Mientras que en los individuos no expuestos al humo de leña, sólo se comparó el genotipo silvestre (G/G) con el genotipo heterocigoto (G/A) debido a que el genotipo mutante (A/A) no estuvo representado, y se encontró una diferencia estadísticamente significativa con una OR de 5.786 y una p= 0.0197.

Tabla 24. Asociación de las frecuencias del polimorfismo TNF α -308 respecto a la exposición a humo de leña entre los grupos de casos y controles.

EXPUESTOS A HUMO DE LEÑA					NO EXPUESTOS			
Genotipo	Control	Casos	OR (I.C.95%)	p	Control	Casos	OR (I.C.95%)	p
Modelo codominante								
Silvestre-G/G	17	24			36	28		
Heterocigoto-G/A	2	7	2.479 (0.457-13.44)	0.2815	2	9	5.786 (1.156-28.95)	0.0197*
Mutante-A/A	0	1	2.143 (0.0822-55.8)	0.4039	0	0	-	-
Modelo dominante								
SILVESTRE	17	24			36	28		
HET+MUT	2	8	2.883 (0.533-15.05)	0.2081	2	9	5.786 (1.115-28.95)	0.0197*

Prueba de χ^2 ($p < 0.05$), I.C.= intervalo de confianza, OR= odds ratio (razón de momios), * valor estadísticamente significativo.

Por último, en la **tabla 24** se agruparon las asociaciones estadísticamente significativas las cuales se encontraron al analizar los datos bajo el modelo codominante.

Se observa una mayor cantidad de asociaciones en el polimorfismo TNF α -308 (las cuales fueron con el sexo masculino, individuos no fumadores, individuos no expuestos al humo de leña y rango de edad de los 61 a los 94 años), se encontraron un total de 4 asociaciones estadísticamente significativas, comparado con el polimorfismo TNF α -238, donde se encontraron 3 asociaciones estadísticamente significativas (que fueron con el sexo femenino, individuos fumadores y rango de edad de los 61 a 94 años).

Tabla 25. Asociaciones significativas de los polimorfismos TNF α -238 y -308 con las variables epidemiológicas. Modelo codominante.

MODELO CODOMINANTE	-238 G/A			-308 G/A		
	Gen.	OR	p	Gen.	OR	p
Masculino				G/A	26.76	0.011
Femenino	G/A	0.1823	0.0233			
Fumadores	G/A	0.2449	0.0413			
No fumadores				G/A	14.53	0.0017
Expuestos						
No expuestos				G/A	5.786	0.0197
35-60 años						
61-94 años	G/A	0.2071	0.0133	G/A	3.512	0.0193

Gen.= genotipo, OR= odds ratio (razón de momios).

Discusión

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica ha sido asociada a múltiples factores de riesgo, y en el presente estudio se incluyeron dos de ellos: la exposición al humo de leña la cual ha sido documentada como un factor de riesgo en población mexicana (Sansores y Ramírez-Venegas, 2002) y el tabaquismo, siendo éste el factor mayormente asociado a la etiología de la enfermedad (PLATINO, 2006 y GOLD, 2011). Al comparar los grupos de casos y controles respecto a estos factores de riesgo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ambos casos, lo que indica que estos factores ambientales están asociados con la EPOC en la muestra de población mexicana incluida en este estudio.

La distribución de los individuos incluidos en el estudio respecto al sexo fue muy similar (35 hombres y 40 mujeres en ambos grupos), y se estratificó de acuerdo con esta variable epidemiológica para determinar la asociación de los factores de riesgo incluidos y mencionados anteriormente. Se encontró que en el caso del tabaquismo, en ambos sexos individuos con hábito tabáquico estuvieron en su mayoría en el grupo de los enfermos con EPOC y el sexo masculino tuvo más individuos fumadores que el sexo femenino, cabe mencionar que mientras la prevalencia del consumo de tabaco ha venido a la baja recientemente en el caso de los hombres, en el caso de las mujeres la prevalencia en su consumo va en aumento sin que se haya alcanzado algún límite (PLATINO, 2006) por lo que estos resultados podrían verse modificados si dentro de algunos años se observa nuevamente la prevalencia en población mexicana dentro de algunos años. Al resultar una diferencia estadísticamente significativa cuando se compararon ambos grupos para ambos sexos, se sugiere que este factor de riesgo ambiental se asocia con la enfermedad en la población mexicana.

Por otro lado, en la exposición al humo de leña sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el sexo femenino, siendo de igual forma individuos expuestos de ambos sexos en su mayoría en el grupo de enfermos que en los controles, dicho resultado concuerda con lo reportado por Ramírez-Venegas y colaboradores en el 2005 donde se describe este comportamiento, por lo que

también se sugiere que este factor ambiental está asociado con la EPOC principalmente en mujeres en la población mexicana; esta asociación con el sexo femenino se da debido a que de manera general en países en vías de desarrollo o comunidades rurales, la leña es comúnmente empleada por su buena función como combustible principalmente en la cocina (Korc y Quiñones, 2002 y OMS, 2007), siendo la mujer la que se encuentra mayormente expuesta a este factor. Además, las viviendas de la población que se expone a este humo generalmente son pequeñas, con poca ventilación y donde un cuarto es utilizado para diversas funciones tal como cocinar o calentarse (Melgarejo, 2009).

La EPOC es una enfermedad de origen multifactorial y se han descrito diferentes vías involucradas en la patogénesis de la enfermedad, dentro de éstas, se han reportado diferentes biomarcadores en la literatura y particularmente los relacionados con la inflamación (Cosio *et al.*, 2009), por ejemplo, en estudios previos de nuestro grupo de trabajo, se encontró una asociación de no riesgo de los polimorfismos -572 (G/A) y -597 (A/A) de IL-6 con la enfermedad (datos sin publicar). Otro gen relacionado con el proceso inflamatorio es TNF α , el cual amplifica esta respuesta a través de la regulación de la expresión de diferentes genes y el incremento en los niveles de esta citocina también conduce a amplificar las respuestas inflamatoria y oxidante, lo cual juega un rol importante en padecimientos respiratorios (Mukhopadhyay *et al.*, 2006). Por otro lado, TNF α también ha sido asociado a los efectos sistémicos de la EPOC (Oudijk *et al.*, 2003).

Dentro de la literatura se encuentran diversos estudios que se han realizado con el fin de determinar la asociación entre los polimorfismos TNF α -238 y TNF α -308 con la EPOC y los resultados varían de acuerdo con la metodología y la población en la que se estudien.

Para el polimorfismo TNF α -238 se reportó una asociación de tipo negativa (de no riesgo) con la EPOC en población caucásica estadounidense: OR= 0.4, p= 0.02 (Gingo *et al.*, 2008), lo cual concuerda con los resultados encontrados en el presente estudio (OR=0.2810, p=0.0149), no obstante, también se han reportado asociaciones de tipo positivas (de riesgo) en población macedonia: OR= 1.319

(Trajkov *et al.*, 2009), indonesia: OR= 2.094 (Tarigan *et al.*, 2014) y taiwanesa: OR= 4.352 (Chiang y Chuang, 2014), sin embargo, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el caso de la población taiwanesa ($p= 0.002$).

Grove y cols. en 1997 así como Bayley y cols. en el 2001 estudiaron el efecto de este polimorfismo y reportaron un incremento en la actividad transcripcional con la presencia de éste, no obstante, Kaluza *et al.*, en el 2000 reportaron un decremento de la actividad transcripcional como efecto de la presencia de este polimorfismo, por lo que se sugiere que los individuos incluidos en nuestro estudio con la variante alélica A pueden seguir esta tendencia y la participación del polimorfismo en el desarrollo de enfermedades como la EPOC puede ser variable dependiendo de la población, o incluso del individuo de estudio. Por lo tanto, debido a las diferencias de los resultados en los estudios realizados, es preciso efectuar mayor investigación sobre esta variante en la población mexicana.

Respecto al polimorfismo TNF α -308, estudios realizados previamente han reportado asociaciones positivas con la EPOC en población taiwanesa: OR= 11.1, $p<0.001$ (Huang *et al.*, 1997), china: OR= 5.0 (Jiang *et al.*, 2005) y caucásica estadounidense: OR= 1.9, $p= 0.03$ (Gingo *et al.*, 2008), lo que concuerda con nuestros resultados (OR=3.430, $p=0.0114$), Sakao y colaboradores en 2005 sugieren que dicho polimorfismo puede estar asociado con el desarrollo de enfisema pulmonar en la población japonesa y en 2012, en población egipcia se reportó una correlación del polimorfismo con el hábito tabáquico para una predisposición al desarrollo de la EPOC (Ezzeldin *et al.*, 2012). Por otro lado, el estudio realizado en 2009 por Stankovic y colaboradores es el primero en encontrar una frecuencia de la variante alélica mayor en el grupo control que en los casos (OR= 0.44, $p=0.043$), seguido del publicado por Tarigan *et al.* (2014) donde reportaron una asociación negativa estadísticamente significativa del polimorfismo con la enfermedad en individuos de población indonesia (OR= 0.436, $p= 0.014$).

El efecto de riesgo observado puede deberse al incremento de la actividad transcripcional que causa este polimorfismo comparado con el alelo normal, el cual fue reportado por Wilson y colaboradores en 1977 mediante un modelo *in vitro*

llevado a cabo en una línea de células B humanas. Esto sugiere que la presencia del polimorfismo tiene un efecto biológico significativo generando una respuesta inflamatoria más intensa y acelerada, y por lo tanto aumenta la susceptibilidad en individuos con este polimorfismo expuestos a los factores de riesgo de la enfermedad.

Varios autores señalan que algunas combinaciones de SNPs, las cuales se denominan haplotipos y que están dadas por el desequilibrio de ligamiento, pueden modificar la regulación transcripcional y alterar procesos como la inflamación (Terry *et al.*, 2000). No obstante, al determinar el desequilibrio de ligamiento entre los dos polimorfismos (TNF α -238 y TNF α -308) encontramos que no están en desequilibrio, lo que concuerda con lo reportado por García-Ramírez y colaboradores en 2015 donde reportan el mismo resultado. De esta forma, a pesar de la cercanía física existente entre las variantes alélicas, nuestros resultados sugieren que no se heredan en bloque sino que lo hacen en forma independiente.

El presente estudio es el segundo que se ha llevado a cabo con el fin de determinar la asociación de los polimorfismos TNF α -238 y -308 con la EPOC en la población mexicana. Los resultados encontrados concuerdan parcialmente con los reportados en el primer estudio realizado por Reséndiz *et al.*, 2015 ya que en dicho estudio ambos polimorfismos presentan una asociación de riesgo con la enfermedad dada por el genotipo heterocigoto (G/A): OR=4.220 y p=0.001 para TNF α -238, y OR=2.07 y p=0.038 para TNF α -308, lo que concuerda con lo encontrado en el caso de este último (OR=3.430 y p=0.0114), no obstante, en el caso del primer polimorfismo, el resultado contrasta con la asociación de no riesgo encontrada en nuestro estudio (OR=0.281 y p=0.0149). Cabe mencionar que a diferencia del estudio realizado por Reséndiz y colaboradores, donde sólo se trabajó con individuos fumadores, en el presente trabajo se incluyeron para ambos grupos (casos y controles) individuos no fumadores así como también se incluyó la variable de exposición al humo de leña.

Se estratificó a la población de acuerdo con las variables de edad, sexo, tabaquismo y exposición a humo de leña para determinar la asociación de estas variables con los polimorfismos TNF α -238 y TNF α -308.

Los individuos incluidos en este trabajo tuvieron un rango de edad de los 35 a los 94 años, con una media de 66.3 años en el grupo control y 68.25 años en el grupo de casos. Cuando se estratificaron en 2 grupos, se encontró que el intervalo de los 61 a los 94 años con genotipo heterocigoto tuvo asociación negativa con el polimorfismo TNF α -238 (OR= 0.2071, p= 0.0133) y asociación positiva con el polimorfismo TNF α -308 (OR= 3.512, p= 0.0193). El análisis de las frecuencias de estos polimorfismos a distintas edades en individuos con EPOC ha sido poco estudiado, y nuestros resultados sugieren que el efecto de estos polimorfismos es mayor conforme el individuo va envejeciendo lo cual se correlaciona positivamente con el decremento que se tiene en la función pulmonar (Fletcher y Peto, 1977). Se sugiere realizar un análisis más exhaustivo de manera que se incluyan muestras de individuos enfermos y controles en intervalos más pequeños de edades con el fin de buscar asociaciones en intervalos de edad más estrechos para la población mexicana.

En el caso del sexo, se encontró una asociación negativa del polimorfismo TNF α -238 con el sexo femenino (OR= 0.1823, p=0.0233), y no así con el sexo masculino donde no hubo asociación. Por el contrario, para el polimorfismo TNF α -308 se encontró asociación positiva sólo para el sexo masculino (OR=26.76, p=0.011); lo que sugiere que el sexo masculino presenta mayor susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad. De manera general se ha considerado a la EPOC como una enfermedad cuya prevalencia es mayor en hombres, esto se debe a que en las mujeres, hormonas tales como estrógenos y progesterona pueden jugar un rol protector contra las lesiones en tejido pulmonar (Sakao *et al.*, 2001). Se ha demostrado también, que los niveles de producción de TNF α en sangre periférica varían considerablemente en mujeres premenopáusicas, siendo los niveles más constantes tanto en hombres como en mujeres postmenopáusicas, lo cual puede ser regulado por las hormonas femeninas (Jacob *et al.*, 1990). Esto sugiere que además del rol protector que pueden otorgar las hormonas femeninas, también son menos susceptibles a desarrollar la EPOC en edades jóvenes a comparación de los hombres.

Respecto al tabaquismo, para el polimorfismo TNF α -238 se encontró una asociación negativa con individuos fumadores (OR= 0.2449, p= 0.0413), mientras que el polimorfismo TNF α -308 se asoció significativamente de manera positiva con individuos no fumadores (OR= 14.53, p= 0.0017). Por otro lado, en la exposición al humo de leña sólo se encontró asociación positiva del polimorfismo TNF α -308 con individuos no expuestos (OR= 5.786, p= 0.0197).

Cabe recordar que las variables epidemiológicas incluidas en el estudio, no son los únicos factores de riesgo asociados a la enfermedad, de acuerdo con lo reportado por Sansores y Ramírez-Venegas en el 2002, la exposición a contaminantes independientes del humo de tabaco o de leña, como polvos, gases derivados de procesos industriales u otros productos de combustión, son factores de riesgo asociados a la EPOC; así mismo, también se ha visto que la presencia de infecciones respiratorias durante la infancia, puede predisponer un deterioro funcional pulmonar más rápido y favorecer el desarrollo de la enfermedad en la edad adulta (Zhou *et al.*, 2009). Es entonces que se sugiere que en los individuos incluidos en este estudio, participan de manera importante los factores anteriormente mencionados y por tanto, juegan un rol importante en la generación de la respuesta inflamatoria y la consecuente expresión de TNF α .

A pesar de que se determinó el tamaño de muestra necesario para un estudio de casos y controles en población mexicana con los polimorfismos TNF α -238 y TNF α -308, no fue posible alcanzar el tamaño de muestra previamente calculado debido a la dificultad que representa la obtención de las muestras, sin embargo, el trabajo fue realizado como un estudio piloto por la importante participación de las citocinas en el proceso inflamatorio que se presenta durante la EPOC y tener evidencia de la participación de estos polimorfismos en la población mexicana.

Por último, se propone alcanzar el tamaño de muestra calculado y si es posible superarlo, además de completar el registro de datos faltantes en las variables de tabaquismo y exposición al humo de leña para poder determinar si las diferencias estadísticas aquí reportadas se mantienen, se observan otras y/o si por el contrario desaparecen.

Conclusiones

En este estudio se confirma la asociación del tabaquismo con el riesgo a desarrollar la EPOC para ambos sexos; en el caso de la exposición a humo de leña, se confirma la asociación de esta con la EPOC sólo para el sexo femenino. Dichos resultados concuerdan con los datos previamente reportados para la población mexicana.

Los polimorfismos TNF α -238 y TNF α -308 se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg lo que indica que las frecuencias genotípicas se encuentran estables. Por otro lado, no se encontraron en desequilibrio de ligamiento y por lo tanto no se puede construir un haplotipo con los polimorfismos aquí estudiados a pesar de su cercanía física.

Se encontró una asociación de no riesgo del polimorfismo TNF α -238 con la EPOC en una muestra de individuos mexicanos, y al estratificar a la población, se observó el mismo comportamiento con el sexo femenino, individuos fumadores y con un rango de entre los 61 a 94 años de edad.

El polimorfismo TNF α -308 presentó asociación de riesgo con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en una muestra de individuos mexicanos, así mismo, la asociación se mantuvo al estratificar a la población con el sexo masculino, individuos no fumadores, no expuestos al humo de leña y con edad entre los 61 a 94 años.

Finalmente, se sugiere que la presencia de ambos polimorfismos puede alterar la susceptibilidad individual para el desarrollo de la enfermedad frente a los factores de riesgo reportados.

Referencias

- AARC. 1996. Clinical Practice Guideline. Spirometry, Update. *Respiratory Care*; 41: 629-36.
- Agustí, A. 2005. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*; 2:367-70.
- ALAT. 2006. Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción Pulmonar [Consultado el 19 de octubre de 2015]. Disponible en: http://www.platino-alat.org/docs/libro_platino_es.pdf.
- ALAT. 2011. Asociación Latinoamericana de Tórax [Consultado el 22 de octubre de 2015]. Disponible en: <https://www.alatorax.org/epoc/guía-epoc-alat>
- American Thoracic Society, 1986. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive disease (COPD) and asthma. *American Review of Respiratory Disease*; 136:225-244.
- American Thoracic Society, 1987. Standars for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COP) and asthma. *American Review Respiratory of Disease*; 136: 225-245.
- American Thoracic Society, 1995. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care of Medicine*; 152:S77-S121.
- Anoosheh, S., P. Farnia, M. Kargar. 2011. Association between TNF-alpha (-857) gene polymorphism and susceptibility to tuberculosis. *Iranian Red Crescent Medical Journal*; 13(4): 243-248.
- Barnes, P.J., B.R. Celli. 2009. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *European Respiratory Journal*; 33(5):1165-1185.
- Bucchioni, E., S.A. Kharitonov, L. Allegra, P.J. Barnes. 2003. High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. *Respiratory Medicine*; 97:1299-1302.

- Burrows, B., R.J. Knudson, M.G. Cline, M.D. Lebowitz. 1977. Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function. *American Review Respiratory Disease*; 115:195-205.
- Chiang, C.H., C. H. Chuang. 2014. Transforming growth factor-B1 and tumor necrosis factor alfa are associated with clinical severity and airflow limitation of COPD in an Additive Manner. *Lung*; 192: 95-102.
- Cornelis, L.V. 1999. Tumor necrosis factor gene polymorphisms as severity markers in rheumatoid arthritis. *Annals of Rheumatoid Disease*; 58 (Suppl I):I20-I26.
- Cosio, M.G., M. Saetta, A. Agusti. 2009. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *The New England Journal of Medicine*. 360 (23): 2445-54.
- D'Alfonso, S., P.M. Riciardi. 1994. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics*; 39:150-154.
- Danilko, K.V., G.F. Korytina, L.Z. Akhmidishina, D.G. Ianbaeva, S.Z. Zagidullin, T.V. Victorova. 2007. Association of cytokines genes (ILL, IL1RN, TNF, LTA, IL6, IL8, IL0) polymorphic markers with chronic obstructive pulmonary disease. *Molecular Biology*, 41: 26–36.
- Decramer, M., W. Janssens, M. Miravittles. 2012 Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 379:1341-1351.
- Dennis, R.J., D. Maldonado, S. Norman, E. Baena, G. Martinez. 1996. Woodsmoke exposure and risk for obstructive airways disease among women. *Chest Journal*; 109(1):115-119.
- Dinarello, C.A., L.L. Moldawer. 1999. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. A primer for clinicians. *Amgen*, Thousand Oaks, CA, USA.
- Ezzeldin, N., A. Shalaby, H.A. Saad. 2012. Association of TNFalfa-308G/A, SP-B 1580C/T IL-13-1055C/T gene polymorphisms and latent adenoviral infection with chronic obstructive pulmonary disease in an Egyptian population. *Archives of Medical Science*; 8: 286---95.

- Ferrarotti, I., M. Zorzetto, M. Beccaria. 2003. Tumour necrosis factor family genes in a phenotype of COPD associated with emphysema. *European Respiratory Journal*; 21: 444–449.
- Fletcher, C., R. Peto. 1977. The natural history of chronic airflow obstruction. *British Medical Journal*; 1: 1645-1648.
- Freeman, C.M., J.L. Curtis, S.W. Chensue. 2007. CC chemokine receptor 5 and CXC chemokine receptor 6 expression by lung CD8+ cells correlates with chronic obstructive pulmonary disease severity. *American Journal of Pathology*; 171:767-776
- Fukuchi, Y., M. Nishimura, M. Ichinose. 2004. COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study. *Respirology*; 9:458-65.
- García-Ramírez, R.A., A. Ramírez-Venegas, R. Quintana-Carrillo, A.E. Camarena, R. Falfán-Valencia, J.M. Mejía-Aranguré. 2015. TNF, IL6, and IL1B polymorphisms are associated with severe influenza A (H1N1) virus infection in the mexican population. *PLoS ONE*; 10 (12).
- Gingo, M.R., L.J. Silveira, Y.E. Miller. 2008. Tumour necrosis factor gene polymorphisms are associated with COPD. *European Respiratory Journal*; 31(5):1005–1012.
- GOLD. 2014. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease [Consultado el 15 de octubre de 2015]. Disponible en:
http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Pocket_Spanish.pdf
- Grove, J., A.K. Daly, M.F. Bassendine, C.P. Day. 1997. Association of a tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility to alcoholic steatohepatitis. *Hepatology*; 26: 143-146.
- Guo, X., H.M. Lin, M. Montaña, R. Sansores, G. Wang, S. DiAngelo, A. Pardo, M. Selman, J. Floros. 2001. Surfactant protein gene A, B, and D marker alleles in chronic obstructive pulmonary disease of a Mexican population. *European Respiratory Journal*; 18:482-490.

- Hnizdo, E., P.A. Sullivan, K.M. Bang, G. Wagner. 2002. Association between chronic obstructive pulmonary disease and employment by industry and occupation in the US population: A study of data from the third national health and nutrition examination survey. *American Journal of Epidemiology*; 156(8):738-746.
- Huang, S.L., C.H. Su, S.C. Chang. 1997. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic bronchitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 156 (5):1436–1439.
- Ibelgaufts, H. Dictionary of cytokines. Ed. 5^a. New York, NY: Editorial VCH, p. 777.
- Inoko, H., J. Trowsdale. 1987. Linkage of TNF genes to the HLA-B locus. *Nucleic Acids Research*; 15: 8957-8962.
- Jiang, L., B. He, M.W. Zhao, L.D. Ning, W.Y. Li, W.Z. Yao. 2005. Association of gene polymorphisms of tumour necrosis factor-a and interleukin-13 with chronic obstructive pulmonary disease in Han nationality in Beijing. *Chinese Medical Journal*; 118: 541–547.
- Kaluza W., E. Reuss, S. Grossmann, R. Hug, R.E. Schoppf, P.R. Galle, E. Maerker-Hermann, T. Hoehler. 2000. Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism. *Journal of Investigative Dermatology* ; 114 (6):1180-1183.
- Korc, M., M. Quiñones. 2002. Diagnóstico comparativo de la calidad del aire de los interiores de las viviendas de dos poblaciones indígenas en el Perú. Documento interno. Lima: CEPIS.
- Kroeger, K.M., K.S. Carville, U. Abraham. 1997. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Molecular and Immunology*; 34: 391-199.
- Kucukaycan, M., M. Van Krugten, H.J. Pennings. 2002. Tumor necrosis factor-a +489G/A gene polymorphism is associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research*; 3: 29.

- Lopez, V.M.V., M. Montes de Oca, R.J. Halbert, A. Muiño. 2010. Sex-related differences in COPD in five latin american cities: the PLATINO study. *European Respiratory Journal*; 36(5):1034-1041.
- Lundback, B., A. Lindberg, M. Lindstrom. 2003. Obstructive lung disease in northern sweden studies. Not 15 but 50% of smokers develop COPD? Report from the obstructive lung disease in northern sweden studies. *Respiratory Medicine*; 97:115-22.
- Mannino, D.M., R.C. Gagnon, T.L. Petty. 2002. Obstructive lung disease and low lung function in adults in the United States: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Archives of Internal Medicine*; 12; 160:1683-9.
- Mannino, D.M., D.M. Homa, L.J. Akinbami, E.S. Ford, S.C. Redd. 2002. Chronic obstructive pulmonary disease surveillance-United States, 1971---2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries*; 51:1-16.
- Melgarejo P.I.G. 2009. Tabaco y leña, factores de riesgo en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica "EPOC" 2005-2007. *BIOFARBO*; 17 (1): 59-66.
- Miravittles, M., J.B. Soriano, F. García-Río, L. Muñoz, E. Duran-Tauleria, G. Sanchez. 2009. Prevalence of COPD in Spain: impact of undiagnosed COPD on quality of life and daily life activities. *Thorax*. 64:863–868.
- Mousa, K.A., M.A. Ghoneim, B.N. El-Mashad, E.A. El-Ghobashy. 2014. TNF- α genetic polymorphisms and its expression in Egyptian rheumatoid arthritis patients. *American Journal of Life Sciences*; 2(4): 234-240.
- Mukhopadhyay, S., J.R Hoidal, T.K. Mukherjee. 2006. Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. *Respiratory Research*; 7:125.
- Murray, C.J., Lopez, A.D. 1997. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*; 349(9064):1498-1504.

- Organización Mundial de la Salud. 2007. Desarrollo sostenible y salud ambiental. En: La Salud en las Américas. Washington, D.C.: OMS. Vol. I-regional.
- Oudijk, E.J., J.W. Lammers, L. Koenderman. 2003. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*; 46: 5s-13s.
- Ozdoğan, N., N. Tutar, R. Demir, C. Saatçi, A. Kanbay, H. Büyükoğlan. 2014. 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? *Revista Portuguesa de Pneumología*; 20 (6): 305–310.
- Pauwels, R.A., A.S. Buist, P.M. Calverley, C.R. Jenkins, S.S. Hurd. 2001 Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshopsummary. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 163:1256-76.
- Pauwels, R.A., K.F. Rabe. 2004. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Lancet*; 364:613-620.
- Pérez, P.R., J. Regalado, S. Vedal, P. Pare. 1996. Exposure to biomass smoke and chronic airway disease in mexican women. A case-control study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 154: 701-706.
- Pinto-Plata, V.M., H. Müllerova, J.F. Toso. 2006. C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and nonsmokers. *Thorax*; 61:23-28.
- Pope, R.M., A. Leutz, S.A. Ness. 1994. C/EBP β regulation of tumor necrosis factor a gene. *Journal of Clinic Investigation*; 94:1449-1455.
- Rego-Pérez I., M.M. Fernández, V.G. Carreira, F.J. Blanco. 2009. Polimorfismos genéticos y farmacogenética en la artritis reumatoide. *Reumatología Clínica*; 5 (6); 268-279.
- Reséndiz, H.J.M., H.R. Sansores, Z.R.J. Hernández, A.G. Vargas, B.L. Colín, U.M. Velázquez, A. Camarena, V.A. Ramírez, V.R. Falfán. 2015. Identification of genetic variants in the TNF promoter associated with COPD secondary to

- tobacco smoking and its severity. *International Journal of COPD*; 10: 1241-1251.
- Rusznak, C., P.R. Mills, J.L Devalia, R.J Sapsford, R.J. Davies, S. Lozewicz. 2000. Effect of cigarette smoke on the permeability and IL-1beta and sICAM-1 release from cultured human bronchial epithelial cells of never-smokers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*; 23:530-536.
- Sakao, S., K. Tatsumi, H. Igari, Y. Shino, H. Shirasawa, T. Kuriyama. 2001. Association of tumor necrosis factor a gene promoter polymorphism with the presence of chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 163: 420–422.
- Sanchís, J., P. Casan, J. Castillo, N. González, L. Palenciano, J. Roca, 1989. Normativa para la práctica de la espirometría forzada. *Archivos de Bronconeumología*; 25: 132-42.
- Sansores, M.R., V.A. Ramírez. 2002. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la celebración de su primer Día Mundial. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México*; 15 (4):199-200.
- Sapey, E., A.M. Wood, A. Ahmad, R.A. Stockley. 2010. Tumor necrosis factor-alpha rs361525 polymorphism is associated with increased local production and downstream inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 182(2):192–199.
- Scanlon, P.D., J.E. Connett, L.A. Waller, M.D. Altose. 2000. Smoking cessation and lung function in mild-to-moderate chronic obstructive pulmonary disease . The lung health study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 161(2):381-390.
- Sibille, Y., H.Y. Reynolds. 1990. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *American Review of Respiratory Disease*; 141:471-501.
- Silverman, E.K. 2002. Genetic epidemiology of COPD. *Chest Journal*; 121: Suppl. 3, 1–6.

- Stoller, J.K., L.S. Aboussouan. 2005. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet*, 365 (9478): 2225-2236.
- Tarigan, A.P., S. Tamsil, Y. Faisal, S. Yahwardiah, S. Din. 2014. Association of tumor necrosis factor alpha (TNFa) gene polymorphism with presence of chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*; 4(7): 47-51.
- Terry, C, V. Loukaci, F. Green. 2000. Cooperative influence of genetic polymorphisms on transcriptional regulation. *The Journal of Biology Chemistry*; 24: 18138-18144.
- Tracey, K.J. 1994. Tumor necrosis factor-alpha. En: Thomson A. The cytokine hand book, Ed. 2^a, San Diego California, *Academic Press*; pp. 289-300.
- Trajkov, D., S.J. Mirkovska, A. Petlichkovski, A. Strezova, M.O. Efinska, E. Sandevska, O. Sibinovska, S. Hristomanova, E. Djulejic, J. Petrov, J. Gogusev, M. Spirski. 2009. Association of cytokine gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonar disease in macedonians. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*; 8(1): 31-42.
- Valencia F.R. 2002. Factor de necrosis tumoral: Actividad biológica en neumopatías intersticiales. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México*; 15 (1): 48-53.
- WHO. 2007. World Health Organization [Consultado el 19 de octubre de 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs292/en/index.html>
- WHO. 2008. World Health Organization [Consultado el 22 de octubre de 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/tobacco/mpower/2008/es/>
- WHO. 2012. World Health Organization [Consultado el 29 de octubre de 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs315/en/>
- Wilk, J.B., R.E. Walter, J.M. Laramie, D.J. Gottlieb, G.T. O'Connor. 2007. Framingham heart study genome-wide association: results for pulmonary function measures. *BMC Medical Genetics*; 8: 1:8.

Wilson, A.G., J.A. Symons, T.L. McDowell, H.O. McDevit, G.W. Duff. 1997. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor a promoter on transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 94: 3195-3199.

Yamamoto, C., T. Yoneda, M. Yoshikawa. 1997. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest*; 112:505-510.

Zhou, Y., C. Wang, W. Yao, P. Chen. 2009 COPD in chinese nonsmokers. *European Respiratory Journal*; 33(3):509-518.